

## 総 説

# カプサイシンと TRP チャネル・サブファミリーおよびカプサイシン受容体 (TRPV1) と小型一次知覚ニューロンの特性とその相関関係

中川 弘, 樋浦 明夫\*

キーワード: TRP チャネル, カプサイシン受容体 (TRPV1),  
侵害受容性ニューロン, 一次知覚ニューロン, IB4

## Capsaicin, Transient Receptor Potential (TRP) Protein Subfamilies and the Particular Relationship between Capsaicin Receptors and Small Primary Sensory Neurons

Hiroshi NAKAGAWA, Akio HIURA\*

**Abstract :** A number of subfamilies of the capsaicin receptor, collectively called TRP, have been reported since the discovery of vanilloid receptor 1 (VR1). The term "TRP" is derived from "transient receptor potential", which means the transient and rapid defect of reaction following long stimulation with light in the photoreceptor cells of mutant *Drosophila*. The common features of TRP family members are the centrally situated six transmembrane domains, in which an ion channel is located. The TRP family members are present in animals, including invertebrates and vertebrates, and in the cells in various tissues in individual animals. During evolution, the original TRP seems to have acquired a wide variety of functions related to sensing the inner or outer environment (e.g. to sensing light: *Drosophila*), osmolarity, protons, temperature, ligands and mechanical force). In mammals, the TRP subfamily is exclusively expressed in small- to medium-sized primary sensory neurons that also co-express some chemical markers (i.e. isolectin B4: IB4), fluoride-resistant acid phosphatase (FRAP), the P2X<sub>3</sub> purinoceptor (a receptor provoked by ATP-induced nociception) and Ret, a glial cell-line derived neurotrophic factor receptor). There is a paradox in that regardless of the marked or complete loss of noxious, small sensory neurons (polymodal nociceptors) in mice treated with capsaicin during the neonatal period, as well as in VR1 (TRPV1)-deficient knock-out mice, the responses to noxious heat are normal. Regarding the paradox in mice treated with capsaicin as neonates, our explanation is that although capsaicin probably reduces the number of a subgroup of small neurons (IB4-, VR1+), the remaining IB4+ (VR1-) neurons can sense noxious heat normally. One working hypothesis is that mice lacking TRPV1/2 can sense noxious heat under normal conditions, presumably via another still unknown pathway, and TRPV1 has been suggested to be involved in noxious heat transduction under pathological conditions, such as inflammation and tissue injury. Further studies will be required to clarify these complexities. Mice treated with capsaicin as neonates would provide a model to investigate the above paradoxes, as would TRPV1-knock-out mice, although different mechanisms may be operating in the two models. This article is reproduced from the current review published in

徳島大学医学部・歯学部附属病院高次歯科診療部

Center for Advanced Dental Health Care, Tokushima University Hospital

\*徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔組織学分野

\*Department of Histology and Oral Histology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School

the Anatomical Science International (Vol. 81, 2006) under the approvals by the chief editor of ASI and Blackwell Publishing.

## はじめに

Caterina ら<sup>1)</sup> (1997) によるカプサイシン受容体 (Vanilloid receptor: VR1) の最初の報告以来, 侵害受容性 (組織損傷を伴う痛みを感知) 一次知覚ニューロン (三叉神経節や脊髄神経節に存在する) に対するカプサイシンの作用は細胞膜上の VR1 チャンネルの機能として分子レベルで調べられることになった。最近10年間にカプサイシン受容体の研究はホットなテーマとなり多くの総説がある。この総説では小型一次知覚ニューロンとカプサイシン受容体の関係を神経解剖学的な視点から解説する。最初に, カプサイシンとそのアナログとアンタゴニスト, カプサイシン受容体発見の経緯, カプサイシン受容体 VR1 (TRPV1) のサブファミリーを含む transient receptor potential (TRP) タンパク質の一般的な分子構造について文献を基に概説する。VR1 がカプサイシンとそのアナログ, 熱, プロトン, 機械的ストレスなどの侵害刺激を仲介する受容体であることは良く知られている。カプサイシン受容体の発現と小型一次知覚ニューロンに特異的に存在するフッソ抵抗性酸性フォスファターゼ (FRAP), イソレクチン B4 (IB4), P2X<sub>3</sub>, TrkA, Ret など他の神経化学的マーカーとの関係を述べる。In vivo と in vitro における小型知覚ニューロンに対する上記の特殊な神経化学的マーカーを利用した最近の形態学と電気生理学的手法を併用した研究成果について論じる。最後に, 新生仔期のカプサイシン投与による小型一次知覚ニューロンの特徴的な減少とそれらの動物の侵害熱刺激に対する正常な反応という矛盾を最近のカプサイシン受容体に関する報告を基に論じる。カプサイシン受容体を VR1 と表記するか TRPV1 と表記するかは引用した原著の表記に従った。ただし, 著者らはカプサイシン受容体が TRPV ファミリーの一員であるとの理解の下で, バニロイド受容体という特徴を重視して従来の VR1 という標記を優先的に使用した。

## カプサイシン受容体の分子構造

### 1. カプサイシンの化学構造とその作用

トウガラシ red pepper はナス属 genus *Capsicum* の果実で, その原産地はラテンアメリカである。メキシコではトウガラシを7000年以上前から栽培し, 食料あるいは調味料として利用している。トウガラシは16世紀の, いわゆる大航海時代に世界中に広がった。今日, トウガラシとその類似果実 (辛味のないピーマンから最も辛いハバネーロまで) は世界の 1/4 の人々によって日々食されている<sup>2)</sup>。トウガラシの辛味成分はカプサイシノイド capsacinoids (カプサイシン類) と呼ばれている熱感作

物質である。カプサイシノイドは主としてカプサイシン Capsaicin, デイハイドロカプサイシン Dihydrocapsaicin, ノルデイハイドロカプサイシン Nordihydrocapsaicin, ホモカプサイシン Homocapsaicin, ホモデイハイドロカプサイシン Homodihydrocapsaicin から成る。その特徴的な化学構造はバニリルアミン (Vanillylamine) と種々の脂肪酸の間のアミド結合にある (図1)。これらの成分の割合はナス属の種類によって異なり, カプサイシンとデイハイドロカプサイシンがカプサイシノイドの約90% を占める<sup>3)</sup>。

カプサイシンの化学構造決定の経緯については Gorvindarajan (1986)<sup>4)</sup> の総説に詳述されている。それによると, Buncholz が1816年にナス属の辛味成分は有機溶媒に溶解することで抽出できることを発見した。Thresh は1846年に辛味成分の結晶化に成功し, それをカプサイシンと命名した。1898年に Micks はカプサイシンの分離と純化の方法を改善し, それがハイドロキシルとメトキシルの両グループを含みバニリンに構造上類似していることを指摘した。バニリン (図2) は熱帯アメ

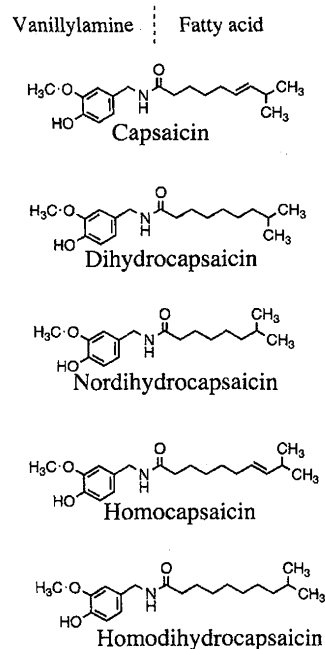


図1 カプサイシノイドのタイプ。カプサイシノイドは主にカプサイシン, デイハイドロカプサイシン, ノルデイハイドロカプサイシン, ホモカプサイシン, ホモデイハイドロカプサイシンから成る。それらの化学構造の特徴はバニリルアミンと各種の脂質を結合するアミドにある。

リカ原産でラン科バニラ属の蔓性植物の果実から獲られる強い芳香を発する成分で、バニラアイスクリームの香りに使われている。このようにカプサイシンは早くから発見されていたが、1919年に Nelson<sup>5)</sup> がカプサイシンはバニリールアミンとデイセン酸の異性体との縮合物であるという正確な化学構造について報告した。Nelson と Dawson による異性体中の二重結合の発見によってカプサイシンの化学構造は8-メチル-6-ノネノイルバニリルアミドであることが1923年に確定された<sup>4)</sup>。

我々はトウガラシを含む激辛食物を口にすると燃えるような痛み (灼熱) を感じる。逆に、トウガラシが鎮痛効果を持つことはアメリカ原住民が歯痛を軽減するために歯肉にカプシクムの実を塗ることで理解できる<sup>6)</sup>。このようなカプサイシンによって誘導される奇妙な生物学的作用の最初の研究はトウガラシの一品種で、辛味の少ないパプリカ paprika の一大生産国ハンガリーの科学者によって成された。カプサイシンの生理学的作用解明の先鞭を切った中心的人物は、パプリカから大量のビタミン C を抽出して1937年にノーベル賞を受賞したセント・ジェルジーと同じセグド大学のニコラシュ・ヤンチョ (N. Jancsó) である。カプサイシンが侵害刺激によって活性化される一次知覚ニューロンを選択的に興奮させ、またカプサイシンによる長期刺激がカプサイシンに対する感受性を低下 (脱感作) させることが報告された<sup>7)</sup>。カプサイシンの一次知覚ニューロンに対する特異的な作用と共に、体温調節に関わる視床下部ニューロンを活性化または傷害することも明らかにされた<sup>8)</sup>。さらにカプサイシンを生後早期のラットに投与すると小型の一次知覚ニューロンが選択的、不可逆的に減少することが示された<sup>9)</sup>。これは、カプサイシンの使用がカプサイシン感受性でかつ侵害受容性である知覚ニューロンを探索する絶好の手段になりうることを示した点で極めて重要な発見である。カプサイシンの化学的侵害受容性線維<sup>10)</sup> (酸やアルカリ物質等で痛みを感じる神経) と一次知覚ニューロンに対する選択的な作用、動物種による感受性の相違<sup>11)</sup> (例えば鳥類はカプサイシンに非感受性である)、またカプサイシンのアナログやアンタゴニストの存在などによってカプサイシンの特異的、薬理的な受容体の存在が長い間予想されてきた。

## 2. カプサイシンの協力薬と拮抗薬

カプサイシンとその類似物質はバニリル基を共通に持つことからバニリルグループと総称される。自然界でバニロイド (バニリル基を含む物質) は抽出される生物体によって4種のグループに分類される<sup>2)</sup>。これらのグループの典型はカプサイシノイド capsaicinoids, レシニフェラノイド resiniferanoids, イソヴェレラロイド isovelleraloids, トリフェニールフェノール triphenyl phenols と呼称されている (図3)。各グループの代表的な物質はカプサイシンがナス属 *Capsicum*<sup>5)</sup>, レシニフェ

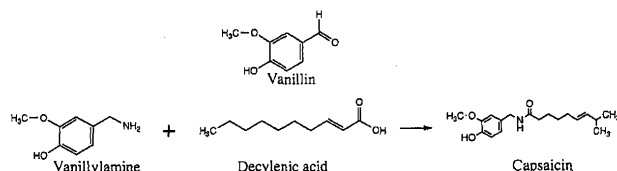
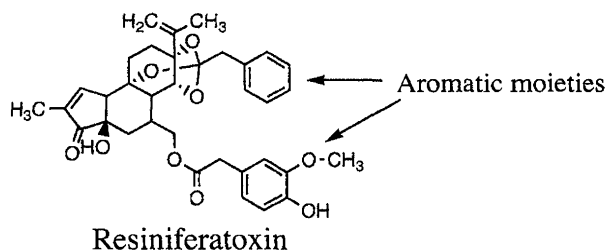
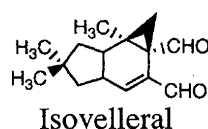


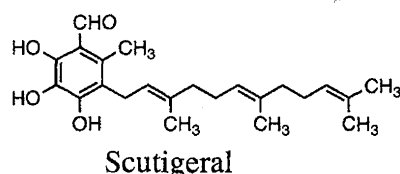
図2 カプサイシンの化学組成。カプサイシンはバニリンと似ている。バニリールアミンとロイヤルゼリーの一成分デイセン酸の異性体が縮合してカプサイシンができる。



Resiniferatoxin



Isovelleral



Scutigerol

図3 カプサイシンのアナログ。レシニフェラトキシシン (RTX) はサボテンタイゲキ *Euphorbia resinifera* から抽出される。イソヴェレラールはキノコのケシロハツ *Lactarius vellereus* から抽出される。スクチゲラルはキノコのニンギョウダケモドキ *Albatrellus ovinus* から抽出される。RTX はカプサイシンより数千倍も強い効力を持っている。

ラトキシシン (RTX) がモロッコ原産のサボテンタイゲキ *Euphorbia resinifera*<sup>12, 13)</sup> (トウダイグサ属), イソヴェレラールがキノコのケシロハツ *Lactarius vellereus*<sup>14)</sup> (チチタケ属), スクチゲラル scutigerol がキノコのニンギョウダケモドキ *Albatrellus ovinus*<sup>15)</sup> (ニンギョウダケモドキ属) から抽出された。バニリル vanillyl がカプサイシンと RTX に共通なことが発見された<sup>12, 13)</sup>。RTX はカプサイシンと同様に興奮性と脱感作作用を示し、その効力はカプサイシンの数千倍であることが明らかにされた<sup>16, 18)</sup>。Victory ら<sup>17)</sup> は RTX がカプサイシンと同様な作用を示すことを示唆した。RTX は二つの可塑的な芳香

環 aromatic moieties を結合する相対的に強固なディテルペン骨格 (20個の炭素と32個の水素を有す) を持っている。以前にカプサイシンの受容体はカプサイシンが特異的に作用することからカプサイシン受容体 capsaicin receptor と言われたが, カプサイシンと RTX にバニリルが共通することが分かりバニロイド受容体 vanilloid receptor と言われるようになった。RTX はカプサイシンより数千倍強力なアナログ物質である<sup>16, 18)</sup>。そのフェニールオルソアセテートグループはホモバニリル部位とテルペノイド核の間の特殊な配列を非共有疎水性相互作用で維持している<sup>17)</sup>。カプサイシンはそれが皮膚に触れると最初に痛みを起こす。カプサイシンの多用は, 初期の粘膜や皮膚の燃えるような痛みを侵害刺激に対する長期的な非応答性 (脱感作) に誘導する。長いアシル鎖または変化したフェノールグループを持つアナログはこの脱感作作用がカプサイシンよりも弱い<sup>10, 19)</sup>。たくさんのカプサイシンのアナログが合成され, 研究されてきた。典型的に長いアシル鎖を持つアナログのオルバニル olvanil (oleoylvaniillylamide) (図4) はカプサイシンより効力が弱い<sup>20)</sup>。放射性のカプサイシンを使ったカプサイシン受容体の研究はその結合能が弱いために成功しなかった。相対的に高い放射活性を持つ <sup>3</sup>H-RTX が後根神経節 (DRG) ニューロンにカプサイシンが結合するのを調べるための放射性リガンドとして使用された<sup>21, 22)</sup>。その結合部位は DRG ニューロンとそれらの中枢性, 末

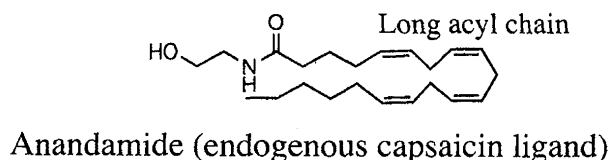
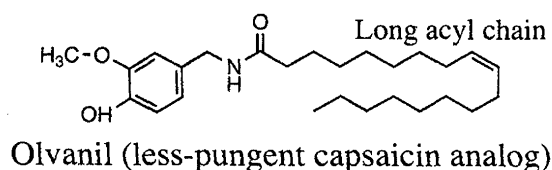
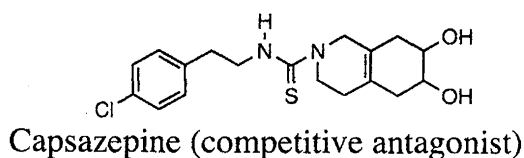


図4 カプサイシンのアナログとアンタゴニスト。カプサゼピンはカプサイシンの競合的な拮抗剤。長いアシル鎖を持つオルバニルは活性の弱いカプサイシンのアナログ。カプサゼピンとオルバニルは合成剤。アナンドアミドはカプサイシンの内因性リガンドとして有力な候補物質。その構造はオルバニルと良く似ている。

梢性終末に見られた<sup>22-24)</sup>。<sup>3</sup>H-RTX の結合部位がニューロンや末梢性終末に見られたことはカプサイシン受容体の存在を強固なものにした。バニロイド受容体の存在は最終的にカプサゼピン capsazepine (図4) の薬理的な利用によって立証された。カプサゼピンはカプサイシン受容体と RTX 結合部位に競合的に結合する<sup>18, 25)</sup>, しかしオルバニルに対しては競合しない<sup>26)</sup>。このことはバニロイド受容体のサブタイプの存在を示唆した。実際, 最近の研究でカプサゼピン非感受性な辛味を感知しないバニロイド受容体の存在が実証された<sup>27)</sup>。無機の色素であるルテニウム赤 (カルシウムチャネル阻害薬) は機能的なカプサイシン・アンタゴニストとして知られている。その分子レベルの拮抗作用については現在のところ不明である。ルテニウム赤がカプサイシン受容体のカルシウムチャネル部位に不可逆的に結合するためと示唆されている<sup>28)</sup>。また, ルテニウム赤は知覚神経の細胞膜上のシアル酸残基に結合することでカプサイシン誘導性の脱感作を阻害する, という報告<sup>29)</sup> やバニロイド受容体の RTX 結合部位にかなり選択的に結合するという報告<sup>30)</sup> などがある。

### 3. バニロイド受容体の発見とその性質

カプサイシンが原形質膜の Ca イオン透過性を高めることで侵害受容部位を興奮させることは良く知られている。細胞内への Ca イオン流入を目安にした発現クローニング法を使って知覚ニューロンのカプサイシン受容体をコードしている機能的な cDNA が単離された<sup>1)</sup>。In situ ハイブリダイゼーションによって, バニロイド受容体 (VR1) は小型 (無髄神経を出す) から中型 (小径の有髄神経 = Aδ 線維を出す) の一次知覚ニューロンに優先的に発現することが示された<sup>1)</sup>。これらの結果は小型の知覚ニューロンが痛みを伝達するという従来の知見と一致する。

Caterina ら<sup>1)</sup>は VR1 遺伝子を導入した HEK293 細胞 (ヒト胚性腎由来細胞) の膜電位を電気生理学的に測定した。パッチクランプ法による研究から, VR1 は Ca イオン優先的だが, 非選択的な陽イオン透過性による外向き整流を示すイオンチャネルであることが分かった<sup>1)</sup>。VR1 を導入した細胞から単一チャネルパッチを取り出して実験に使用することで, 細胞内の二次的な情報をシャットアウトした状態でカプサイシンの直接的な作用が解析された。カプサイシンによって誘導される全細胞記録電流はカプサイシンの反復投与によって Ca イオンを含む溶液下で脱感作を示した<sup>1)</sup>。脱感作の理由は Ca イオン結合タンパクのカルモジュリンが VR1 に結合し, VR1 が不活性化されるためと説明されている<sup>31)</sup>。

トウガラシを食べると熱さと同時に痛みを感じることもある。カプサイシン受容体遺伝子を導入された HEK293 細胞の VR1 チャネルは周囲の温度が 43℃ を超えると開く。侵害熱刺激に誘導された電流がカプサイシ

ンに誘導されたと同様な電気生理学的特性を示すことは VR1 が熱刺激に直接応答することを意味する<sup>32)</sup>。組織の虚血や炎症による乳酸の蓄積は障害部位の pH 6 以下の酸性化をもたらす。そのような酸性化が痛みを促進、強化すると信じられている。実際, VR1 導入細胞の VR1 が細胞外を酸性化することで活性化された<sup>32)</sup>。その活性化閾値は組織障害が起こる pH 6 (室温下) である。このように, プロトン ( $H^+$ ) は VR1 に対する別なタイプの刺激因子であることが確証された。従って, VR1 は少なくとも三種の刺激, カプサイシン, 熱, プロトンによって活性化される。これらによる刺激はわれわれの身体に痛みをもたらす, これらを感じ取る受容体は各種の刺激に反応性があるという意味で多種侵害受容器 polymodal nociceptor と呼ばれる。カプサイシン受容体に対する内因性リガンド endovanilloids の存在は明らかではない。アラキドン酸の代謝物質のアナンドアミド anandamide (アラキドニールエタノールアミド, 図4) はオルバニルと化学構造が酷似しているカプサイシン受容体の有力な内因性リガンドと考えられている<sup>33)</sup>。アナンドアミドは大麻中毒 cannabism の原因物質であるマリファナ marijuana (大麻) が結合するカンナビノイド受容体の内因性リガンドとして脳内から抽出された。血管内皮とマクロファージにおけるアナンドアミドの生合成経路は知られているが, その作用機構は未知である。しかし, アナンドアミドは血管周囲に分布する知覚神経のバニロイド受容体に作用し, それらの神経終末からカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) の放出を促し, その結果 CGRP によって血管拡張が誘導されるという報告がある<sup>34)</sup>。アナンドアミドが TRPV1 に直接作用するという実験的な事実はない。しかし, アナンドアミドが血圧や炎症組織での侵害受容に TRPV1 を経由して作用することを示唆する報告がある<sup>35)</sup>。

#### 4. カプサイシン受容体の用語

当初, TRP は, 白眼変異体のショウジョウバエの網膜光受容細胞における電位曲線が強く持続的な光刺激に対し一過性に反応した後, 急速に元に復帰する (transient response) ことで命名された<sup>36)</sup>。Cosens と Manning<sup>37)</sup> によって初めて変異体ショウジョウバエの網膜光受容細胞における光刺激に対する不完全な反応が報告された。アミノ酸1275個をコードしている変異 *trp* 遺伝子が Montell と Rubin により発見された<sup>38)</sup>。彼らは *trp* タンパクが8個の膜貫通領域 (TM ドメイン) を持つことを示唆した。Trp タンパクは TM ドメインと細胞内の膜表面層蛋白の一つであるスペクトリンを結ぶ3個または4個のアンキリン ankyrin (各33個のアミノ酸残基を持つ) の反復領域をアミノ末端に持っている (図5)。Trp ファミリー中の反復アンキリンの進化における高度な保在性は *trp* の機能の本質的な役割を暗示する<sup>39)</sup>。現在, たくさんの *trp* 蛋白のホモログ (相同体, 図6) が見つかった。

そのホモログは共通に6個の TM ドメイン (S1-S6) と25個のアミノ酸から成る *trp* ドメインを持っている。Trp ドメインの6個のアミノ酸 (Glu-Trp-Lys-Phe-Ala-Arg) は動物種に共通しているゆえに *trp* ボックスと言われる。この独特な領域の機能は不明である<sup>39)</sup>。Trp 蛋白の中心に位置して, *trp* ファミリーに共通に保存されている疎水性領域の TM ドメインはチャネル機能を有することが示唆された<sup>39)</sup>。カプサイシン受容体の VR1 は6個の TM

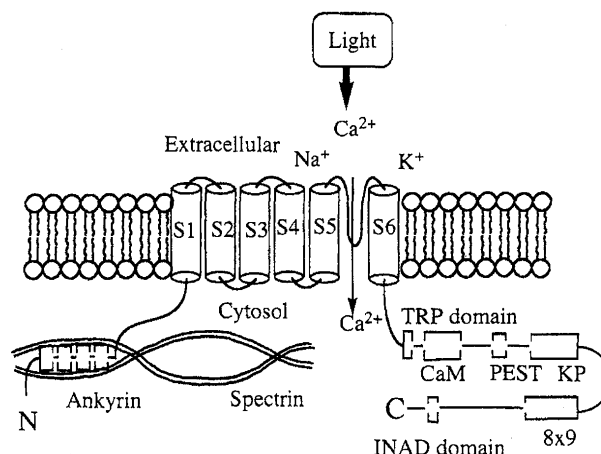


図5 ショウジョウバエの *trp* タンパクの構造。Trp は4個のサブユニット (四量体) から成る。そのうちの1個のサブユニットを図示した。Trp サブユニットは6個の膜貫通領域 (TM ドメイン) を持ち, その5番 (TM5) と6番 (TM6) の間に孔 (チャネル) がある。Trp はまた3ないし4個の反復アンキリン領域をN末端に, 25個のアミノ酸から成る *trp* ドメインをC末端近くに持っている。CaM: カルモジュリン結合部位, PEST: CaM 結合蛋白に典型的なカルシウム依存性プロテアーゼ, カルパインによるタンパク分解のシグナル部, KP (リジン, プロリン): 2個のペプチド, リジーン-プロリンを27回反復するプロリンに富む領域, 8 X 9: 独特な親水性配列 (Asp · Lys · Asp · Lys · Lys · Pro · Gly / Ala · Asp) の9回の繰り返し, INAD (inactivation no after potential D) ドメイン: 5個の蛋白相互作用モチーフ (約90個のアミノ酸から成る PDZ 領域) を含む *trp* 複合体の分子的足場。PDZ は post-synaptic density protein (PSD)-95, disc-large tumor suppressor (Dlg), zonula occludens protein (ZO-1) として同定された。(文献39から改変)。INAD ドメイン, 神経栄養因子受容体 (TrkA, TrkB), ホスホリパーゼ, PKC, ホスファチジルイノシトール-4, 5-ビスホスフェイト ( $PIP_2$ ), カルモジュリンなどが付着した *trp* は *trp* 複合体 (シグナル複合体) または誘導体 transducisome と呼ばれる<sup>47)</sup>。これらの複合体は TRPV1 の機能を調節することでその感作や脱感作などを誘導すると考えられている<sup>50)</sup>。

ドメインを持ち、その中の5番と6番目のドメインの間に孔がある。また、N末端にアンキリンの反復領域があり、C末端に trp ドメインを持つ。このことから、カプサイシン受容体 VR1 は trp ファミリーの一員に分類され、新たに一時的受容体タンパク質バニロイド1 (transient receptor protein vanilloid 1: TRPV1) と命名された<sup>40)</sup>。

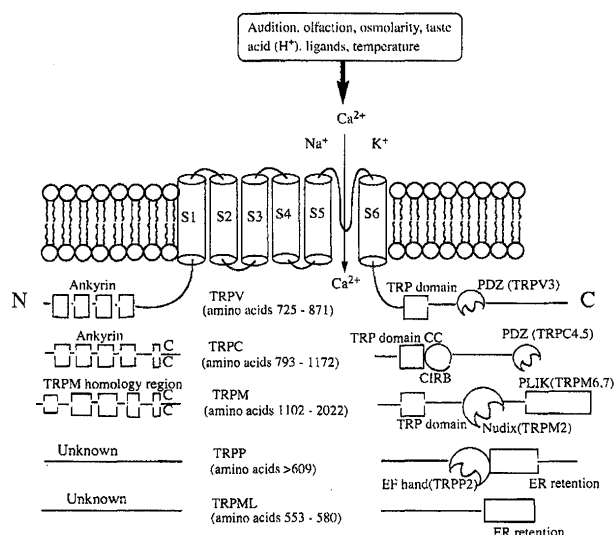


図6 Trp タンパクの細胞内ドメインの多様性。TRPV サブファミリーは725から871のアミノ酸から成りN末端に3個の反復アンキリン領域とC末端に trp ドメインを持つ。ラットの VR1 (TRPV1) との相同性が85%であるヒトの VR1 は3個のアンキリン領域を持つ838個のアミノ酸から成り、カプサイシン、プロトン、侵害熱刺激に应答する<sup>91)</sup>。TRPV3 のみがタンパク相互作用モチーフ (PDZ ドメイン) を持つ。TRPC はN末端に反復アンキリン領域とC末端にカルモジュリンとイノシトール1, 4, 5-三リン酸 (IP<sub>3</sub>) 受容体結合ドメイン (CIRB) を持つ。ヒトの TRPC1 末端近くに coiled-coil (CC) ドメイン (らせん状に畳み込まれた領域) とC末端にジストロフィンドメインを持つ<sup>39)</sup>。TRPC4 と TRPC5 は PDZ 領域を持つ。TRPM はN末端に TRPM に相同な領域とC末端に trp ドメインを持つ。TRPM2 はADP リボースと結合する NUDT9 ヒドラーゼ蛋白と相同なヌーディックス Nudix を持つ。TRPM6 と TRPM7 はホスホリパーゼC反応性のキナーゼ (PLIK) を持っている。TRPP はER (小胞体) 内保存性のタンパクを保有している。TRPP2 はCaイオン結合ドメインである標準的なループで隔てられた2個のヘリックス (helix-loop-helix) のEFハンドを持つ。TRPML はER内保存性蛋白を持つ。結局、6個の膜貫通ドメインの構造と相同性が trp ファミリーの特徴となっている<sup>40)</sup>。(文献40から改変)

## 5. TRP ファミリー

Ca イオンチャネルには電位依存性と受容体依存性の二つのタイプがある。Trp チャネルは後者のタイプである。しかし、温度感受性の全ての trp チャネル (後述) は膜電位に対して共通に弱い感受性を持っていて、チャネルの開閉は電位変化に鋭敏で、それを支えるのが温度変化であることが注目された<sup>41)</sup>。チャネルの活性化と開閉の分子のメカニズムは完全には知られていない<sup>39)</sup>。哺乳類の trp ファミリーはC末端とN末端におけるアミノ酸配列が異なる6個のサブファミリーから成る。これらのサブファミリーは、TRPC (canonical TRP), TRPV (vanilloid TRP), TRPM (melastatin TRP), TRPA (ankyrin-like with transmembrane domains 1; ANKTM1), TRPP (polycystin TRP), TRPML (mucolipins TRP) と呼ばれている<sup>40)</sup>。これらのサブファミリーの特徴について概説する。

### (1) TRPC サブファミリー

1-7種のTRPCメンバーがある<sup>40)</sup>。TRPC サブファミリーとショウジョウバエの trp との間にはかなりの相同性がある。特に、TRPC ファミリーは中心に位置する6個のTMドメインとN末端にアンキリンの繰り返し領域、C末端にカルモジュリンとイノシトール3リン酸 (IP<sub>3</sub>) 受容体結合領域 (CIRB) を持つ (図6)。TRPC チャネルはG蛋白結合受容体とチロシンキナーゼ受容体の刺激によって活性化される<sup>40)</sup>。ショウジョウバエの trp と25-30%の相同性を持つラットの TRPC2 (rTRP2) はラットの鋤鼻器の神経上皮細胞の微絨毛に特異的に見られる<sup>42)</sup>。鋤鼻器の TRP2 欠損 (TRP2<sup>-/-</sup>) オスマウスは他のオス個体に対してフェロモン誘導性の攻撃性がなくなると共に性を識別した交尾行動ができなくなる (オス個体にマウンティング行動をとる)<sup>43)</sup>。このように、TRP2 は性の識別と性行動に重要な役割を持っている。最近、TRPC1<sup>44)</sup> と TRPC3<sup>45)</sup>、TRPC6<sup>45)</sup> が培養下のアフリカツメガエルの脊髄ニューロン<sup>44)</sup> とラット小脳皮質顆粒細胞<sup>45)</sup> の成長円錐の運動に、脳由来神経成長因子 (BDNF)<sup>44, 45)</sup> または BDNF と netrin-1<sup>44)</sup> によって調節されたCaイオンの流入を介し寄与することが示された。

### (2) TRPV サブファミリー

現在、TRPV サブファミリーはTRPV1-6の存在が知られている<sup>40)</sup>。そのうちTRPV1-TRPV4は温度感受性があり、TRPV5とTRPV6は腎臓や小腸でのCaイオンの取り込みに関与している。TRPV4の相同体で、浸透圧、嗅覚、機械的ストレスを感知する線虫 *C. elegans* の ocr1-4 チャネルに類似している OSM-9 はTRPV サブファミリーにおける無脊椎動物と脊椎動物の分岐点に位置する<sup>46)</sup>。ここでは脊椎動物のものについてだけ言及する。

#### 1) TRPV1 (VR1) 受容体

TRPV1 受容体はTM5とTM6の間に孔 (チャネル)

がある6個のTMドメインを有し, またN末端に3個の反復アンキリン領域とC末端にtrp領域を持っている。(図6)。哺乳動物ではアンキリン領域が酸, カプサイシン, 熱などによるVR1の活性化に重要であると考えられている<sup>47)</sup>。鳥類の一次知覚ニューロンがカプサイシンに非感受性なのは非常に不思議で興味深い<sup>48)</sup>。鳥類がバニロイド非感受性なラットVR1のホモログを持つという仮説を検証するためにラットVR1とニワトリVR1からのキメラチャネルを用いてバニロイド感受性が調べられた<sup>49)</sup>。その結果, TM3領域近くのたった8個のアミノ酸の違いが哺乳類と鳥類の機能的な差異を生み出すと結論された。また, ウサギのTRPV1はラットやヒトに比べてカプサイシン, RTX, オルバニルに対する感受性が1/100程度弱い。この原因として, ラットとヒトのTM3-TM4領域(505番のセリンSer<sup>505</sup>から550番のスレオニンThr<sup>550</sup>まで)をウサギのその領域と置換すると, ウサギTRPV1はラットやヒトと同様な感受性を持つようになることがCaイオンの取り込みや電気生理学的な実験から明らかにされた<sup>50)</sup>。ウサギのTM3/4領域の547番のロイシンをメチオニンに変換(L547M)し, 550番のイソロイシンをスレオニンに変換する(I550T)と<sup>3</sup>H-RTXがウサギのTRPV1に結合するという実験結果から, Tyr<sup>511</sup>, Met<sup>547</sup>, Thr<sup>550</sup>が結合芯binding pocketに存在し, バニロイド感受性の重要な部位であると推定された<sup>50)</sup>。(TRPV1におけるバニロイド結合部位のチャネル部位とC末端領域の分子構造とそれらの機能的役割については総説<sup>51)</sup>を参照)。In vivoとin vitroの実験から, 自然状態でTRPV1のN末端領域に結合している細胞死に関わるFasの関連因子1(Fas-associated factor 1: FAF1)が, それを除去した純粋なTRPV1のみの場合よりカプサイシン, 熱, 酸に対する感受性を低下させることから, FAF1が侵害受容における負の調節因子として機能しているという報告があり<sup>52)</sup>, TRPV1を介する作用発現の複雑さの一端を示している。

後根神経節(DRG)や三叉神経節(TG)でTRPV1は小型から中型のニューロンに優先的に発現する<sup>1)</sup>。またTRPV1の免疫活性は, 後根や三叉神経を經由する侵害受容性一次知覚ニューロンが終止する脊髄後角や延髄の三叉神経尾側亜核のII層(表層)に強く発現する<sup>32)</sup>。その他, TRPV1は迷走神経が終止する延髄の孤束核や大脳の皮質に発現する<sup>53)</sup>。最近, カプサイシンとアナンドアミドがラット黒質のドーパミンニューロンの細胞死をin vivoとin vitroで誘導し, その神経毒作用はドーパミンニューロンに共発現するTRPV1とカナビノイドタイプ1(CB1)受容体を介するという興味ある報告がなされた<sup>54)</sup>。これらの受容体とパーキンソン病との何らかの関わりが推測される。TRPV1の発現は膀胱や尿路を含むその他の組織の粘膜の神経叢にも見られる<sup>55, 56)</sup>。TRPV1が角質細胞keratinocytesに発現することから, TRPV1は皮膚の侵害刺激のセンサーと示唆され

ている<sup>57)</sup>。TRPV1はカプサイシン, 熱, プロトンの互いにクロストークする3種の侵害刺激によって活性化される。小型知覚ニューロンのサブタイプで発見されたTRPV1とインスリンレセプターの共発現は, 初期II型糖尿病における熱に対する痛覚過敏heat hyperalgesiaを高濃度の血中インスリンによるTRPV1の活性化で説明できる可能性がある<sup>58)</sup>。さらにラット切歯の象牙芽細胞の細胞膜とトームスの線維でTRPV1の有意な発現が示された<sup>59)</sup>。パッチクランプ法により象牙芽細胞内でカプサイシンに誘導される内向き電流が記録され, これは象牙芽細胞の侵害受容性機能を示唆する<sup>59)</sup>。

ごく最近, 森川<sup>60)</sup>は, インターロイキン受容体の一つであるオンコスタチンMの受容体(OSMR $\beta$ )が成熟マウスのDRGとTGの小型ニューロンに特異的に発現することを報告した。それらはTRPV1とP2X<sub>3</sub>受容体を共発現したが, サブスタンスP(SP)とCGRPは共発現しなかった。また侵害受容性の小型一次知覚ニューロンの中枢性突起が終止する脊髄後角の膠様質(SG: II層)とそれらの遠心性突起が終止する皮膚にTRPV1とP2X<sub>3</sub>の共発現が見られた。これらのことからOSMが侵害刺激の伝達に関与することが示唆された<sup>60)</sup>。

## 2) TRPV2 (VRL-1) チャネル

TRPV1の発現に続きそのホモログであるTRPV2のクローニングが行われた。最初, TRPV2はVR1に由来するVRL-1(Vanilloid receptor like-1)と呼ばれた<sup>61)</sup>。TRPV2はTRPV1のアミノ酸配列と約50%の相同性を示し, 6個のTMドメインを持つイオンチャネルと想定された。TRPV2はカプサイシンとプロトンに反応しない。TRPV1は無髄のC線維を出す小型の一次知覚ニューロンに特異的に発現するが, TRPV2は中型から大型のニューロン(平均直径29.0 $\pm$ 0.6  $\mu$ m)に発現する<sup>61)</sup>。それらのニューロンから出る有髄のA $\delta$ 線維にTRPV2の発現が免疫細胞化学的に示された<sup>61-62)</sup>。A $\delta$ 線維は熱に対する反応性からIA $\delta$ とIIA $\delta$ の2つのタイプに分けられる<sup>61)</sup>。IA $\delta$ 線維は52 $^{\circ}$ Cの高閾値で反応し, カプサイシン非感受性なのに対し, IIA $\delta$ 線維の閾値は43 $^{\circ}$ Cでカプサイシン感受性である<sup>61)</sup>。しかし, サルの皮膚hairy skinに分布する知覚神経の生理学的な実験から, 熱に非感受性だがカプサイシンに感受性なタイプのIA $\delta$ 線維の存在が報告されている<sup>63)</sup>。いずれにせよIA $\delta$ 線維はカプサイシンと熱がクロストークしないことを示している。TRPV2は52 $^{\circ}$ C以上の温度で活性化されるので高閾値温度に反応する分子と考えられている。TRPV2を介する高いCaイオンの透過性に関連する陽イオンの流れはTRPV1を介するのと同様に電流を活性化し, 外向き整流(脱分極)を誘導する<sup>64)</sup>。TRPV2は成長中あるいは成熟マウスのDRGニューロンのチロシンキナーゼ受容体C(TrkC)陽性なサブグループに高レベル発現が見られた<sup>65)</sup>。それ故に, ニューロトロフィン-3(NT-3)は52 $^{\circ}$ C以上の高閾値侵害熱刺激に感受性の小型から中型

の DRG ニューロンの発達と生存に関与することが示唆された。さらに TRPV2 の免疫活性は温度感知に関係しない A $\beta$  線維や運動ニューロン<sup>61, 62)</sup>、肺、脾臓、小腸などの非神経組織<sup>61)</sup> にも見られた。通常、上記の組織は 50℃ 以上の温度にさらされることはないの、侵害熱刺激以外の圧や触刺激によって活性化されると予想された<sup>61-62)</sup>。興味あることに TRPV2 はインスリン様成長因子によって活性化される<sup>66, 67)</sup>。

### 3) TRPV3 (VRL-3) チャネル

TRPV3 チャネルは 32–39℃ の温度で開く<sup>68-70)</sup>。TRPV3 は TRPV1 近傍の遺伝子から転写され、TRPV1 と複合型チャネル heteromeric channels を形成している可能性がある。TRPV1 と TRPV3 のサブユニットの混ぜ合わせ (heteromeric) を含む TRPV1/3 四量体は単一の四量体 (TRPV1 ないし TRPV3 の同一のサブユニットだけから成る：単一型チャネル homomeric channel) と異なる反応特性を持つと考えられる。TRPV3 は TRPV1 と同じく反復熱刺激によって閾値が低下する顕著な感作を示す<sup>68)</sup>。TRPV3 ノックアウトマウスで 50℃ 以上の熱に対する尻尾ゆらし反応 (tail flick response) と 55℃ の熱に対する後足の引っ込め反応 (withdrawal response) が有意な遅延を示したので、TRPV1 と TRPV3 は急性の侵害熱刺激に対して共通な機能を分け持っていることが示唆された<sup>71)</sup>。

### 4) TRPV4 (VRL-2) チャネル

TRPV4 チャネルは以前に低浸透圧活性化バニロイド受容体 (VR-OAC ; vanilloid receptor-related osmotically activated channel) と呼ばれ、また熱によっても活性化される<sup>72, 73)</sup>。浸透圧が低下すると温度閾値が低下するように浸透圧と熱はクロストークしている<sup>72)</sup>。TRPV4 の発現は末梢知覚ニューロン、視床下部、角質細胞で見られる<sup>72)</sup>。TRPV4 のノックアウトマウスと正常なマウスを直接外部温度にさらすという実験から、TRPV4 は皮膚の温度を感知することが示された<sup>74, 75)</sup>。視床下部は体温の調節に主要な役割を持っているので、TRPV4 は温度受容器、または体温調節の枢軸として機能している可能性がある。

### 5) TRPV5, TRPV6 チャネル

TRPV5 と TRPV6 チャネルはそれらの単一型か、または複合型を構成する異なったサブファミリーから成り、腎臓と小腸の上皮で Ca イオンの輸送に関わっている。それらは最も Ca イオン選択性の強い trp チャネルで、他の trp チャネルが外向き整流を示すのに対して、強い内向き整流を伴って Ca イオンを取り込む<sup>76, 77)</sup>。

### (3) TRPM サブファミリー

TRPM サブファミリーは TRPM1–8 から成る。メラスタチン 1 (melastatin-1) は最初、黒色腫細胞で同定されたが TRPM と相同なため TRPM1 と名づけられた。このサブファミリーは N 末端領域に 793 から 1172 個のアミノ酸から成り他の trp ファミリーより長い。そのため

この trp は長い trp チャネル (LTRPC) に分類された<sup>78)</sup>。哺乳類におけるこのチャネルの機能は、C. エレガンスにおける同様に、細胞の成長、分化、プログラムされた細胞死 programmed cell death (アポトーシス) に関与すると考えられている<sup>78)</sup>。マウスの味覚細胞に発現する TRPM5 は塩辛さと酸味ではなくアミノ酸 (うまみ) と苦味を感じる<sup>79)</sup>。TRPM8 を発現している HEK293 細胞の外液を約 5℃ に、または冷涼剤のメンソールを添加して冷やすと陽イオンの流れが誘導される<sup>80)</sup>。その温度閾値は 8–28℃<sup>81)</sup> で、室温でもメンソールにより反応する<sup>80)</sup> (より高い温度で冷感を感じるようになる)。冷刺激とメンソールの間にクロストークがあることから TRPM8 は TRPV1 と似た特性がある (TRPV1 は酸と熱などの間にクロストークがある)。TRPM8 遺伝子が DRG と TG ニューロンの小型から中型の一次知覚ニューロンに発現することも TRPV1 と似ている。TRPM8 と TRPV1 の共発現は見られないので侵害冷刺激と侵害熱刺激はそれぞれ別なタイプの小型ニューロンを活性化するようだ<sup>81)</sup>。しかしながら、炎症状態でのプロテインキナーゼ C (PKC) による TRPV1 の高い活性化と同時的な TRPM8 の不活性化 (脱リン酸化) が温痛覚過敏の増悪をもたらすことは TRPV1 と TRPM8 の間のバランスの消失を意味する<sup>82)</sup> (つまり温痛覚過敏の増悪に両者が関わっている)。

### (4) TRPA サブファミリー

TRPV1 を発現するある種の知覚ニューロンで見つかった ANKTM1 または p120 としても知られている<sup>83)</sup>。TRPA1 は約 15℃ の侵害冷刺激を感知する<sup>84)</sup>。このチャネルは極度に冷たいドライアイスに触った時に冷感ではなく熱感を感じることに関係しているかもしれない。起炎物質のイソチオシアネイト複合体 isothiocyanate compounds (カラシ油 mustard oil, ワサビの成分) とテトラヒドロカナビノイド (THC, マリファナの成分) は ANKTM1 を介して培養下 TG ニューロンの 20% 以上を興奮させる<sup>85)</sup>。このことはカプサイシン感受性で TRPA1 を発現する小型ニューロンの 30–50% のサブタイプがカラシ油と THC の受容体を持つことを示す<sup>85)</sup>。香料として使用されるシナモン油の主たる成分のシナムアルデヒドとカラシ油は TRPA1 のみを活性化する<sup>86)</sup>。特にシナムアルデヒドは培養下 DRG ニューロンの冷感受容性のサブグループを優先的に活性化する。シナムアルデヒドを口の中に入れるとうずくような灼熱を感じるといわれる。そこで冷刺激による侵害性の灼熱感 TRPA1 の活性化によるシグナルと示唆された<sup>85)</sup>。TRPA1 の発現がマウス蝸牛のコルチ器の内、外有毛細胞とその突起である聴毛 (不動毛) に見られた<sup>87, 88)</sup>。さらに TRPA1 に対する干渉 RNA (interfering RNA) をアデノウイルスに導入して有毛細胞に感染させて TRPA1 を形成阻害したマウスの有毛細胞で、パッチクランプ法による誘導電流が減少した<sup>87)</sup>。また TRPA1 はメンソールよ



りも強力な冷涼剤のイシリン icilin で活性化されたが, 冷刺激によって活性化されなかった<sup>88)</sup> ことから, 冷感以外の侵害受容と機械的感覚 (聴覚) に関係するとされた<sup>87, 88)</sup>。TRPA1 と TRPM は冷刺激に対しそれぞれ別々な知覚ニューロングループとして反応すると考えられている。

#### (5) TRPP サブファミリー

TRPP2, TRPP3 と TRPP5 チャネルは最初, PKD2, PKD2L1, PKD2L2 として同定された。それらは多嚢胞性腎症 polycystic kidney disease (PKD; 常染色体優性遺伝) の原因因子として同定された後, TRPP のサブファミリーとして確認された<sup>40)</sup>。TRPP2 の変異と非常に大きなポリシスチン蛋白の TRPP1 が PKD を引き起こす。TRPP2 は C 末端に EF-hand を持つ。EF-hand はアルファベット順に A-F と命名された 6 個のラセンを有する Ca イオン結合タンパクである (図 6)。細胞間と, 細胞とマトリックス間の相互作用に関与する TRPP1 と TRPP2 は細胞膜に共存し, 新しいチャネルを形成することが報告されている<sup>89)</sup>。

#### (6) TRPML サブファミリー

現在のところ TRPML のサブファミリーとして 1-3 が同定されている。TRPML1 は最初, ムコリピン 1 (mucolipin 1) として分離され, 後に TRPML の相同体とされた (図 6)。それは粘液脂質 mucolipids を分解する酵素の欠損による IV 型ムコリピドーシスの発現因子である。ムコリピドーシス (代謝蓄積症) の患者の体中に粘液脂質が蓄積し, しだいに蓄積した器官が障害される (モルキオ症候群 Morquio syndrome, 常染色体劣性遺伝)。その他, TRPML は胃の壁細胞, 角膜上皮細胞, 軟骨細胞, 腎臓の尿細管上皮細胞などでの分泌に関与していると想定されている<sup>90)</sup>。

上述したように, trp チャネルは光 (ショウジョウバエ), 熱, 機械的な力, 化学的作用物質, 浸透圧, 内外のリガンドなどのような様々な刺激に曝されると機能することが実験的事実として確認されている。生物体がいろんな刺激に曝される特殊な外部的, 内部的環境に対処する必要から, 原初的な共通部は保持しながら trp の改変 (進化) が無脊椎動物でも脊椎動物においても起こった<sup>39)</sup>。いろいろな動物とそれらの様々な組織における trp ファミリーの発現はそれらが広範な機能を持っていることの背景をなしている。

### 小型一次知覚ニューロンとカプサイシン受容体

DRG と TG 内の一次知覚ニューロンには様々な大きさのものがあ。ヒトを含む多くの哺乳類では, DRG ニューロンは, そのサイズによって 1-3 種の集団に分けられているが, 小型ニューロンと大型ニューロンという分類は一般的である<sup>92)</sup>。Coggeshall<sup>92)</sup> は, DRG ニューロンの研究の大きな目標は, 細胞の大きさとその特性

を解明することにあると提起した。今や, 小型一次知覚ニューロンは無髄の軸索を持ち, 小型から中型のニューロンは有髄の A $\delta$  線維を出すということは既定の事実となっている<sup>93)</sup>。無髄の C 線維と A $\delta$  線維は, 末梢の神経終末 (侵害受容器) から, 痛みの情報が最初に調節されると考えられている後角表層への痛みの伝達に関与している。皮膚の侵害受容器の 40% は, 高閾値の機械的刺激, 侵害熱刺激, 化学的刺激に対し興奮するためポリモダル (多種) 侵害受容器と呼ばれている<sup>94)</sup>。カプサイシンレセプターの mRNA は, 小型から中型の一次知覚ニューロンに発現する<sup>95)</sup>。このように, 大きさによる一次知覚ニューロンの分類は基本的な重要性がある。この章では, 主に小型の一次知覚ニューロンとその化学的特性やレセプターに焦点をあてる。

#### 1. 小型一次知覚ニューロンの特性

我々は, マウスの L4 の DRG において, 全体の 52.4% を占める (表 1) 500  $\mu\text{m}^2$  (25  $\mu\text{m}$  径) より小さいニュー

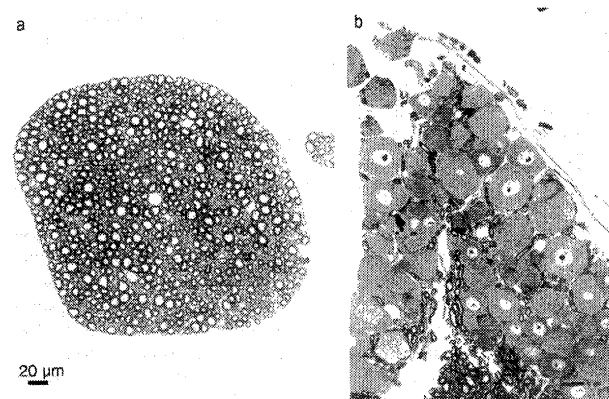


図 7 生後 5 日目の正常マウスの L4 後根 (a) とその神経節 (b) の顕微鏡写真。光顕写真のため後根内に無髄神経 (C 線維) は見えない。いろいろな大きさの知覚ニューロンと有髄神経が存在している。棒は 20  $\mu\text{m}$ 。

表 1 新生仔期にカプサイシン投与した成熟マウスの後根神経節 (L4) ニューロンの各種の大きさにおける減少

Cell size ( $\mu\text{m}^2$ )	Control (n = 5)	Treated (n = 5)	% Decrease
50-250	2365 (14.2%)	578	-75.6
250-500	6343 (38.1%)	2047	-67.7
500-750	3582 (21.5%)	2309	-35.5
750-1000	2240 (13.5%)	1745	-22.1
1000-1250	1444 (8.7%)	1019	-29.4
1250-1500	508 (3.1%)	366	-27.9
1500-1750	130 (0.8%)	118	-9.2
1750-2000	18 (0.1%)	26	33.3
Total	16 630	8208	-50.6 (mean)

500  $\mu\text{m}^2$  以下の小型ニューロンは 69.6% 減少した。

ロンを単純に小型細胞とした<sup>96)</sup>。Guo ら<sup>97)</sup> は、ラット DRG (L5) の VR1 陽性ニューロンの大きさの分布を示し、その50%以上が小型から中型のニューロンであるとした<sup>97)</sup>。小型と中型の区別は判然としないが ( $500 \mu\text{m}^2$  以下が小型ニューロンで、 $500 \sim 900 \mu\text{m}^2$  が中型ニューロンであると推測される)、カプサイシン感受性細胞と VR1 発現細胞の大きさは非常に類似している (図8)。新生仔期のマウスに対するカプサイシン投与による L4 後根の無髄線維の減少の割合 (63.3%) は、 $500 \mu\text{m}^2$  以下の DRG 細胞の減少 (69.6%) とかなり一致する<sup>98)</sup> (図8)。しかし、カプサイシン感受性ニューロンが小型細胞に限局されている一方で、それらの30～40%はカプサイシン抵抗性 (非感受性) であることも見逃せない事実である (図8, 9)。また、マウスのカプサイシン感受性の小型ニューロンの細胞死はアポトーシスではなく、ネクローシス (壊死) である<sup>99)</sup>。

Nagy と Rang<sup>100)</sup> は、成熟ラット DRG から取り出した直径  $30 \mu\text{m}$  未満のニューロンのうち32% (径  $18.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ) はカプサイシン感受性で (全細胞電圧クランプ法で可逆的な内向き電流を示すため)、低熱閾値 ( $45^\circ\text{C}$ ) を持ち、他方、24.6% (径  $25.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ) はカプサイシン非感受性で高熱閾値 ( $51^\circ\text{C}$ ) を有し、さらに28% (径  $17.5 \pm 0.67 \mu\text{m}$ ) はカプサイシンと熱の両方に非感受性であると報告している。Stucky と Lewin<sup>101)</sup> は成熟マウスの DRG ニューロンの小型細胞 (径  $26 \mu\text{m}$  未満) を培養して研究を行った。小型細胞のほぼ半分がイソレクチン B4 (IB4) 陽性であった。Kashiba ら<sup>102)</sup> は、ラットの

DRG (L5) 細胞を小型 (径  $25 \mu\text{m}$  未満)、中型 (径  $25 \sim 40 \mu\text{m}$ )、大型 (径  $40 \mu\text{m}$  超) の3種に分けた。正常マウスの L4 と L5 の IB4 陽性ニューロンの大きさの平均は  $253.8 \mu\text{m}^2$  (径  $18 \mu\text{m}$ ) であるのに対し、遺伝子操作で GDNF (グリア細胞由来神経成長因子) を過剰発現させたマウスでは平均  $516.4 \mu\text{m}^2$  (径  $26 \mu\text{m}$ ) となり、GDNF の栄養作用で大きさが50%増加した<sup>103)</sup>。プロトンで活性化されるラットの小型ニューロン (径  $15 \sim 30 \mu\text{m}$ ) で、IB4 陽性 (径  $22.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ) と IB4 陰性 (径  $22.9 \pm 0.8 \mu\text{m}$ ) の大きさに有意差はなかった<sup>104)</sup>。いずれにしても、このように小型一次知覚ニューロンの大きさを  $500 \mu\text{m}^2$  (径  $25 \mu\text{m}$ ) 以下とするのは妥当であると思われる。

## 2. 小型一次知覚ニューロンの神経化学的マーカー

一次知覚ニューロンの化学的標識である IB4, FRAP, AchE, NsAchE およびレセプターについて紹介する。他の化学的マーカーと DRG ニューロンの大きさの関係については Lawson<sup>93)</sup> の総説がある。

### (1) イソレクチン B4 (Isolectin B4 : IB4)

最近、げっ歯類の小型の DRG ニューロンや TG ニューロンはよく IB4 陽性と陰性に分けて実験される。IB4 は *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* の種子から抽出された植物レクチンである。Mäkelä と Mäkelä<sup>105)</sup> は、その種子から抗 B 凝集素を抽出し、それがヒトの B 型赤血球に特異的に結合することを示した。その後、Hayes と Goldstein<sup>106)</sup> は、*B. simplicifolia* から、多糖類とヒトの B 型赤血球の細胞膜に結合するレクチン (抗 B

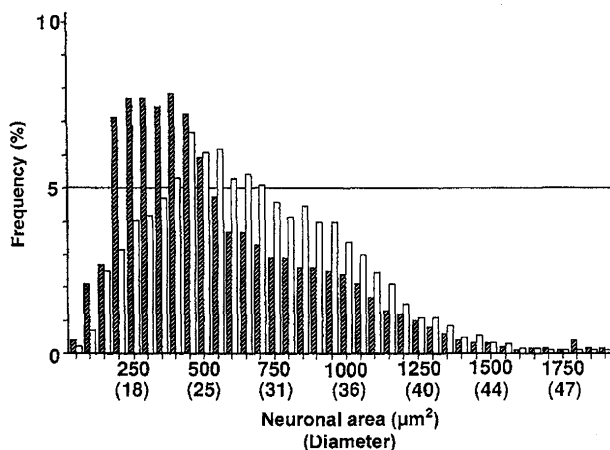


図8 カプサイシン投与マウス (細胞数: 8208, 5匹, 白棒) と溶媒のみ投与 (対照) マウス (細胞数: 16639, 5匹, 斜線棒) の L4 後根神経節 (DRG) ニューロンの大きさ分布。小型ニューロンは  $500 \mu\text{m}^2$  (径  $25 \mu\text{m}$ ) 以下とした。カプサイシン投与 DRG では小型ニューロンが大量に消失する (約70%) ため、その割合が対照群に比べて大きい方に推移する。無髄神経もほぼ同じ割合で減少することから、この大きさの小型ニューロンの7割が無髄神経を出すと推測される。(文献96より転載)

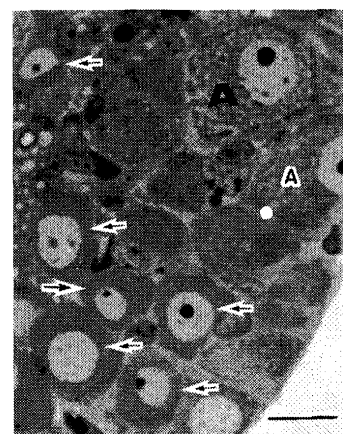


図9 生後2日のマウスにカプサイシン (50 mg/kg) を皮下投与すると、3～5日以内に L4 後根神経節のカプサイシン感受性小型ニューロンは死滅する<sup>146, 147)</sup>。しかし、カプサイシンに抵抗性 (非感受性) のニューロンも存在する (矢印)。細胞の辺縁部にニッスル小体の偏在を示す (大A) 大型のニューロン (A) もカプサイシンの影響を受けている。細胞は全体的に小さいが、生後20日位まで成長する。棒は  $10 \mu\text{m}$ 。(文献146より改変)

レクチン) を分離精製した。これは細胞膜表面における IB4 に対する糖結合体の存在を意味する。Streit ら<sup>107)</sup> は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を結合させた IB4 を用いて、ラットの DRG や TG の小型知覚ニューロンの最初の特徴づけを行った。彼らは知覚ニューロンの大きさによってレクチンの親和性が異なることを明瞭にした。ガラクトースに特異的な IB4 は、800  $\mu\text{m}^2$  未満の小型ニューロン、無髄の知覚神経および後角 SG 内の中枢性終末に局限してラベルされた。レクチンが結合した腰部の小型 DRG 細胞は、新生仔期のカプサイシン投与 (50 mg/kg 腹腔内) により、平均 21% 減少した<sup>108)</sup>。Kashiba ら<sup>102)</sup> は、IB4 に弱くラベルされたニューロン (約 5%) は、強くラベルされたものより大きいことを報告した。IB4 に強くラベルされた細胞はニューロン全体の約 40% を占め、IB4 に弱くラベルされた細胞は、小型細胞内においてさえ 15% のみだった<sup>102)</sup>。

#### (2) フッ素抵抗性酸性フォスファターゼ (Fluoride-resistant acid phosphatase: FRAP)

Knyihár-Csillik と Csillik<sup>109)</sup> は、FRAP 陽性の小型一次知覚ニューロンについて広範囲にわたる総説を著した。一次知覚ニューロンとその中枢 (SG) および末梢部での FRAP の分布に関する彼らの詳細な研究から、侵害刺激伝達の基礎的な形態学の全体像を得ることができる。しかし、FRAP の役割についてはまだ不明である。Nagy と Hunt<sup>110)</sup> は、ラットの DRG において FRAP を発現している小型の細胞集団を分離し、その集団が SP やソマトスタチンを共発現しないことを報告した。Silverman と Kruger<sup>111)</sup> は、ラット DRG の小型細胞集団では FRAP が IB4 と高い割合 (90% 超) で共存するが、CGRP との共存は低い (10% 未満) と述べている。彼らは、SG 全体に FRAP の強い反応が見られるがその辺縁部と SG の背側では反応が弱く (IB4 についても同様)、逆に CGRP の反応は SG の背側と辺縁で強いことを報告した<sup>111, 112)</sup>。これらの分布の違いは、DRG 内の小型または大型ニューロンの反応性の違いを反映している<sup>111, 112)</sup>。著者ら<sup>111, 112)</sup> は、小型ニューロンのペプチド性 (IB4 陰性 = CGRP 陽性) と非ペプチド性 (IB4 陽性 = FRAP 陽性) という明らかに異なる 2 つのタイプが末梢の侵害刺激の受容と伝達において、異なった役割を担うことを示唆した。

#### (3) プリン性 P2X<sub>3</sub> 受容体 (purinergic P2X<sub>3</sub> receptors)

P2X<sub>3</sub> プリノセプターは傷害を受けた組織における ATP 依存性侵害受容器で、リガンド型陽イオンチャネルである。それは Chen ら<sup>113)</sup> によって一次知覚ニューロンから単離され、分子的クローニングを経て、P2X 受容体ファミリーの新しいレセプターとして特定された。彼らは新生仔期にカプサイシンを投与された成長ラットの DRG ニューロンでは P2X<sub>3</sub> mRNA がかなり減少することを示した。このことは、P2X<sub>3</sub> が小型でカプサイシン感受性のニューロン、すなわち侵害受容性ニューロン

で特異的に転写されることを示す。侵害受容器における P2X<sub>3</sub> を介する ATP 活性化仮説は、ラット臼歯歯髄に分布している蛍光色素でラベルした TG 培養ニューロンが ATP により活動電位を誘発されることにより証明された<sup>113)</sup>。

#### (4) TrkA (NGF 受容体) と Ret (GDNF 受容体)

形質転換成長因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) サブファミリーの新メンバーである GDNF は、グリア細胞で産生される中脳のドーパミン性ニューロンの特殊な神経栄養因子として最初にクローニングされた<sup>114)</sup>。Molliver ら<sup>115)</sup> は、NGF や GDNF で処理したマウス DRG 細胞を用いて、IB4 結合ニューロンが生後の早い時期にチロシンキナーゼ A (TrkA) からチロシンキナーゼ Ret (GDNF レセプター) へ発現変化を起こすことを示した。小型ニューロンの約半数が Ret を発現する<sup>115)</sup>。このことは生後の早い時期や成熟した動物において、非ペプチド性の侵害受容性ニューロンの成長と生存を GDNF が調節していることを意味する。Snider と McMahon<sup>116)</sup> は、ラットやマウス DRG の小型細胞は成長とともに TrkA を失い、FRAP やチアミンモノフォスフェイト (TMP) を含むようになり、IB4 と結合するようになることを報告した。IB4 陽性で GDNF 依存性小型細胞の一般的な機能は解明されていないが、GDNF やその関連分子は鎮痛療法において重要なターゲットになる可能性がある<sup>116)</sup>。実際、GDNF 処理が実験的神経損傷 (坐骨神経を部分的に結紮) ラットに鎮痛効果のあることや、L5 脊髄神経結紮によって障害を受けた後根 (L4, L5) で有髄神経の自発的な活性を減少させること、などが報告されている<sup>117)</sup>。フロイント完全アジュバント (CFA) をラット後足底に注入して炎症を起すと、DRG (L4, L5) の IB4 陽性ニューロン中の VR1 陽性ニューロンが対照に比べて 39% から 56% に増加した<sup>118)</sup>。しかし、VR1 陽性中の IB4 陽性ニューロンは 46.2% から 44.9% とわずかに減少し、炎症によって IB4 陽性ニューロンは増えないが、VR1 陽性ニューロンが増えることが示された<sup>118)</sup>。600~1200  $\mu\text{m}^2$  の中等大の (A $\delta$  神経を出す) VR1 (TRPV1) 陽性ニューロンの増加は抗 NGF で抑制され、200~600  $\mu\text{m}^2$  の小型ニューロンの増加は抗 GDNF で抑制された<sup>119)</sup>。その結果、炎症による熱性痛覚過敏が緩和された<sup>119)</sup>。このように抗 NGF、抗 GDNF 投与が炎症による熱性痛覚過敏を緩和するということは、逆にこれらの成長因子がカプサイシン受容体に作用して熱性痛覚過敏に関与することを意味する。さらに、マウスの後足底への CFA 注入による炎症は DRG (L4, 5) の小型ニューロン (<26  $\mu\text{m}$  径) の TRPV1 陽性細胞数を対照に比べ 3 倍に増加させると共に、TRPV1 を介する侵害刺激に対する反応を 3 倍に増加させるという興味ある報告がある<sup>120)</sup>。この場合、IB4 陽性ニューロンが増えるのではなく、IB4 陽性ニューロンが TRPV1 を発現するように変化する。中等大のニューロンが TRPV1 を発現するようになるかどうかについて

は調べられていない。

しかし、IB4 が NGF 非依存性知覚ニューロンにとつて必ずしも有効な化学的マーカーではないことに注意すべきである。なぜなら、ラットの TrkA の mRNA を発現する DRG ニューロンのうち29%は IB4 に強くラベルされるからである<sup>102)</sup>。Fang ら<sup>121)</sup> は、ラットの侵害受容性 C タイプニューロン (小型ニューロン) に限定すると IB4 と TrkA を共発現するのが38%もあり、これが新たな機能特性を持つだろうことを指摘している。

#### (5) アセチルコリンエステラーゼ (AChE) と非特異的アセチルコリンエステラーゼ (NsAChE)

AChE<sup>92)</sup> とアセチルコリンの合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ<sup>122)</sup> は、一次知覚ニューロンに広く存在する。NsAChE の反応では灰白質全体が褐色を呈し、特に三叉神経尾側亜核の SG では濃い反応が常状に見られる (樋浦, 未発表)。それ故、これらの酵素は侵害刺激情報の伝達に何らかの役割を果たしていることが考えられる。しかし、ラット角膜に分布する NsAChE 陽性の神経線維はカプサイシンに抵抗性があり<sup>123)</sup>、またカプサイシン投与後の長期生存に伴いそれらの神経の不規則な発芽が起こるとともに、角膜に血管新生を伴う損傷 (潰瘍形成) が高頻度に発現する<sup>124)</sup>。

### 3. 神経化学マーカーと小型知覚ニューロンの特性

#### (1) VR1, IB4 および P2X<sub>3</sub> の共発現

Guo ら<sup>97)</sup> は、ラットの DRG と TG ニューロンの小型から中型細胞 (200 ~ 1100  $\mu\text{m}^2$ , 最大値400 ~ 800  $\mu\text{m}^2$ ) の50%以上が VR1 陽性であることを示した。VR1 陽性ニューロンは、IB4 と P2X<sub>3</sub> を共発現した (78% VR1 = IB4+, 75% VR1 = P2X<sub>3</sub>, 67% IB4+ = VR1, 75% P2X<sub>3</sub> = VR1)。これらの発現はそれらのニューロンの中樞性突起が終止する脊髄後角表層の腹側 (inner lamina II) でも同様に見られた。他方、小型 DRG 集団やそれらの末梢部 (皮膚や角膜) では、VR1 と SP はほとんど共発現しなかった (VR1 の33%が SP 陽性)。このことから、侵害熱刺激に P2X<sub>3</sub> が関連すると推測された<sup>97)</sup>。また、正常マウス DRG 内の IB4 陽性細胞の87%と、遺伝子操作で GDNF を過剰発現させたマウスの IB4 陽性細胞の81%は P2X<sub>3</sub> 陽性だった<sup>103)</sup>。予想に反し、DRG (L4, L5) 内の VR1 と IB4 の共発現の割合は、正常マウスで2.83%, GDNF 過剰発現マウスで8.62%であった。つまり、VR1 と IB4 の共発現を示すのはマウス DRG の全細胞中で2 ~ 3%である。GDNF 過剰発現マウスの DRG では IB4 陽性ニューロンが50%増加するにもかかわらず、侵害熱刺激 (52℃, 赤外線照射) や機械的刺激 (Von Frey filament, tail flick) に対する反応は野性マウスと GDNF 過剰発現マウスの間で有意差はなかった<sup>103)</sup>。この説明として、マウスの IB4 陽性ニューロン内での VR1 以外の侵害熱刺激を伝えるチャネルの存在が予想された<sup>103)</sup>。

#### (2) IB4 陽性と陰性の小型知覚ニューロンの性質

Stucky と Lewin<sup>101)</sup> は、マウス DRG の小型細胞における IB4 陽性 (非ペプチド性) と IB4 陰性 (ペプチド性) ニューロンの機能的な違いを調べた。蛍光色素で IB4 を標識した DRG ニューロンを単離して電気生理学的な実験を行った。その結果、IB4 陽性ニューロンは、持続的な活動電位の基になる IB4 陰性ニューロンと比べて2倍の大きさの電位ゲートと緩徐なフグ毒 (テトロドトキシン) 抵抗性ナトリウム電流を示した。さらに、IB4 陰性ニューロンは IB4 陽性ニューロンに比べてより大きな熱活性化電流を示した。この研究によって、IB4 陰性ニューロンが急性の痛みに関与する重要な役割を果たすのに対し、IB4 陽性ニューロンは慢性の痛みに関与する重要な役割を果たすという可能性、つまり IB4 陽性と陰性ニューロン間の機能的な違いがはっきりと示された。どちらのニューロンが VR1 の高い発現を示すかに興味をそそられる<sup>101)</sup>。Dirajlal ら<sup>125)</sup> は、成熟マウスの腰部 DRG ニューロンの全細胞パッチ記録法により、IB4 陽性ニューロンと陰性ニューロンの間に同様な違いがあることを報告した。全ニューロンの47%が N52 (大型ニューロンに特異的な高分子量のニューロフィラメント抗体) 陽性で、53%が N52 陰性 (無髄神経をもつ小型ニューロン) であった<sup>125)</sup>。N52 陰性ニューロン (径25  $\mu\text{m}$  未満) の54%は IB4 陽性、46%は IB4 陰性だった (小型ニューロンの約半数が IB4 陽性、残り半数が IB4 陰性)。1  $\mu\text{mol}$  のカプサイシンに対する反応性は IB4 陰性 (ペプチド性) ニューロンでは61%であり、28%の IB4 陽性 (非ペプチド性) ニューロンに比べると約2倍である。前者のニューロンは後者のニューロンよりカプサイシンで大きな内向き電流が起こる。これらのデータから、Dirajlal ら<sup>125)</sup> は、IB4 陰性小型一次知覚ニューロンはカプサイシン、プロトン (pH < 6)、侵害熱刺激などに反応する特殊なタイプの侵害受容性 C 線維であると提起した。あらかじめプロトンに短時間さらされると、IB4 陽性ニューロンはカプサイシンに対する反応性が2 ~ 3倍増強する<sup>125)</sup>。IB4 と VR1 の局在を調べなかったが、IB4 陰性の小型ニューロンは VR1 を発現しているようである<sup>125)</sup>。Liu ら<sup>104)</sup> は、IB4 陽性と陰性とに分けた成熟ラットの DRG ニューロンを24時間培養し、全細胞パッチクランプ法を用いて、カプサイシンおよびプロトン (pH 5 以下) に対する反応を調べた。IB4 陽性と陰性の細胞の直径は22.5  $\mu\text{m}$  と22.9  $\mu\text{m}$  で、有意差はなかった。IB4 陰性小型細胞の多く (69%) は、混合性内向き電流 mixed inward current (図10) を示した。IB4 陽性細胞の共通性 (63%) は持続性電流 sustained current (図10) を示すことにある。このように、IB4 陽性と陰性細胞は有意に異なる電流波形を示した。IB4 陽性と陰性の両細胞において、プロトン誘発性の一過性電流 transient current がアミロリド amiloride (上皮性 Na チャネルブロッカー) で阻害されたが、カプサゼピンの影響はなかつ

た。酸性 (pH 5) 液中でカプサゼピン (10  $\mu$ M) を作用させると, IB4 陽性および陰性ニューロンの持続性電流は81 ~ 84%減少した。このことから, Liu ら<sup>104)</sup> は, 酸に反応する持続性電流は主として TRPV1 を介し, 一過性電流 (図10a) は酸感受性イオンチャネル (ASIC) ファミリー (ASIC2a/ASIC3 or ASIC2b/ASIC3) を介すると結論した。IB4 陽性の小型ニューロンは, ほとんどがカプサイシン感受性で, TRPV1 アゴニスト (例えば, 熱 (42 ~ 52°C) や内因性カンナビノイド (アナンドアミド))

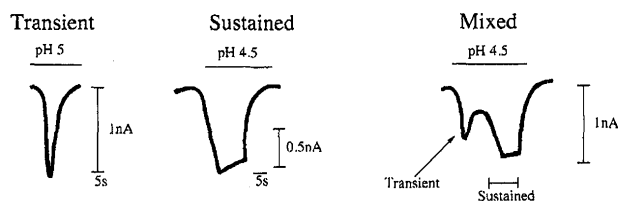


図10 プロトン (pH 5) に誘発される一過性 (transient), 持続性 (sustained), 混合性 (mixed) を示す3種の内向き電流の波形。成熟ラットの後根神経節からのニューロンのほとんどは IB4 陽性 (63%) で TRPV1 を発現し, 持続型の波形を示し, カプサイシン感受性である。IB4 陰性ニューロンのほとんどが混合性の波形を示す。一過性の波形は酸感受性イオンチャネル (ASIC) に由来する。カプサイシン受容体は, プロトン, リガンド, 熱刺激に対して特徴的な持続性反応を示す。(文献104より改変)

に対する反応性において重要な役割を果たしている<sup>104)</sup>。他方, ASIC を優先的に発現する IB4 陰性小型ニューロンは弱酸性化でより活性化されるようである<sup>104)</sup>。要するに, Liu ら<sup>104)</sup> はカプサイシン誘発性電流の発生数や大きさに関して, ラットでは IB4 陽性ニューロンが陰性ニューロンより高いことを示した。他方, 成熟マウスの腰部 DRG ニューロンでは, IB4 陰性ニューロンの方がプロトン, カプサイシン, 侵害熱刺激に反応する電流の発生数や大きさは IB4 陽性ニューロンの2 ~ 4倍であった<sup>125)</sup>。また, マウス DRG ニューロンで IB4 陽性ニューロンの38%がカプサイシン感受性を示し, IB4 陰性ニューロンの37%がカプサイシン感受性を示すという報告がある<sup>126)</sup>。カプサイシン感受性に関わりなく IB4 陰性ニューロンの酸誘導性内向き電流の発生は IB4 陽性ニューロンの2倍以上を示した<sup>126)</sup>。IB4 陰性ニューロンの方が酸に対する感受性が高いという結果は前述の Dirajlal ら<sup>125)</sup> と一致している。マウス DRG ニューロンにおける一過性電流の発生はアミロリド添加や外液の Na を除去すると減少することから ASIC チャネルを経由すると見なされた<sup>126)</sup>。さらに C 線維では TRPV1 が, A $\delta$  線維では ASIC チャネルが酸による痛みの伝達に重要な役割を持つことが示唆された<sup>126)</sup>。上述の様に IB4 陽性, 陰性ニューロン内のカプサイシン感受性ニューロンの割合は同一種 (マウス) でも報告者により異なり, また異種間でも異なっている。

ラット DRG (L4, L5) で IB4 陽性ニューロンの48 ~

表2 イソレクチン B4 陽性の小型知覚ニューロンと陰性の小型知覚ニューロンの特性の違いについての最近の文献

	IB4(+)	IB4(-)	文献
マウス DRG	熱に対する活動電位が持続性 NGFに対する感受性が高い 慢性的疼痛に関与	熱による大きな活動電流 カプサイシンに対してより反応性がある 急性疼痛に関与 VR1(+)	Stucky と Lewin <sup>101)</sup> (1999)
マウス DRG	pH 5 で反応する細胞は33% プロトンによる持続性電流を発現 短時間でH <sup>+</sup> に感作される	カプサイシン, 酸, 侵害熱刺激に対して強い感受性がある pH 5 で反応する細胞は86% 4倍の大きさのカプサイシン誘導電流 プロトンによる混合型の電流波形	Dirajlal ら <sup>125)</sup> (2003)
ラット DRG	83%の細胞が1 $\mu$ molのカプサイシンに反応 63%が酸とカプサイシンによる持続性電流を発現 カプサイシンに対して強い反応性 TRPV1(+)	58%の細胞が1 $\mu$ molのカプサイシンに反応 69%が酸とカプサイシンによる混合型電流を発現 カプサイシンに対して弱い反応性	Liu ら <sup>104)</sup> (2004)
マウス DRG	野性のマウスとTRPV1欠損マウスのIB4(+)細胞とIB4(-)細胞の間に熱閾値 (31 ~ 52度) に差は認められない マウスのIB4(+)細胞の2%がTRPV1陽性 ラットのIB4(+)細胞の48 ~ 57%がTRPV1陽性		Woodbury ら <sup>127)</sup> (2004)
マウス DRG	TRPV1(+): 4.5 $\pm$ 2.1% プロトンによる 持続性電流: TRPV1細胞を介さない TRPV1非依存性	TRPV1(+): 20.9 $\pm$ 12.2% プロトンによる持続性電流: TRPV1細胞を介する TRPV1依存性	Breese ら <sup>120)</sup> (2005)
マウス DRG	38%の細胞がカプサイシン感受性 主たる酸センサー: TRPV1 一過性電流3% (pH 4), 8% (pH 5), 21% (pH 6)	37%の細胞がカプサイシン感受性 主たる酸センサー: TRPV1 一過性電流19% (pH 4), 25% (pH 5), 54% (pH 6)	Leffler ら <sup>126)</sup> (2006)
ラット DRG	89%が400 $\mu$ m <sup>2</sup> (径23 $\mu$ m) 以下の小型細胞 長い活動電位 より大きな負の活動電位	小型~中型細胞: 400 ~ 800 $\mu$ m <sup>2</sup> (径23 ~ 32 $\mu$ m) 短い活動電位	Fang ら <sup>121)</sup> (2006)

DRG: 後根神経節, NGF: 神経成長因子, IB4(+): イソレクチンB4陽性, IB4(-): イソレクチンB4陰性

57%に TRPV1 陽性ニューロンがみられた<sup>127)</sup>。一方、マウス DRG (L4, L5) の IB4 陽性ニューロンでは、マウス特異的な抗体を用いても TRPV1 陽性ニューロンが 1.8 ~ 5.4% しか見られなかった。上記の報告を表 2 にまとめてみると、ラットでは IB4 陽性ニューロンの多くは VR1 を発現するが、マウスでは IB4 陰性ニューロンが VR1 を発現するという重要な相違がある。Woodbury ら<sup>127)</sup> は、神経生理学的研究のために脊髄、マウスの胸部と上腰部の DRG と片側の背側皮神経と一緒に記録槽に浸した (ex vivo cutaneous somatosensory system preparation)。微小電極を DRG 細胞内へ刺入して熱 (31 ~ 52℃) に対するニューロンの反応を記録した。驚くことに、野生タイプと遺伝子改変 TRPV1 欠損マウスの間に温度閾値の有意差はなかった (それぞれ 43.1℃と 44.7℃)。このことは、IB4 陰性と IB4 陽性細胞の侵害熱反応受容器は TRPV1 の存在に影響を受けないことを意味する。これらの結果をもとに、正常マウスでは熱に反応する別のメカニズムが存在するという仮説が提唱された<sup>127)</sup>。一つは TRPV1/2 に非依存性で、他方は TRPV1 依存性である。別なメカニズム (TRPV1/2 非依存性) である前者は正常な状態で侵害熱刺激を感知し、後者は病的な状態 (傷害や炎症) で機能を発揮する<sup>127)</sup>。なぜなら、TRPV1 ノックアウトマウス (TRPV1 欠損) は侵害熱刺激に正常に反応し、ATP やカラゲナン (アイルランドゴケから抽出される多糖類) や CFA によって引き起こされる痛覚過敏を生じないからである。さらに in vivo と in vitro のデータ間に奇妙な相違が見られる。VR1 完全欠損マウスからの培養下小型 DRG ニューロンはカプサイシン、熱、酸に対する反応を示さないが、VR1 完全欠損マウスはこれらの刺激に対して正常な反応を示す<sup>128)</sup>。

最近、神経炎や炎症の痛みに関わる PKC $\epsilon$  を活性化する細胞内経路、cAMP  $\rightarrow$  Epac (cAMP-activated guanine exchange factor)  $\rightarrow$  ホスホリパーゼ C  $\rightarrow$  PKC $\epsilon$  が IB4 を発現する小型 DRG ニューロンと密接に関係するという報告がある<sup>129)</sup>。

### 新生仔期にカプサイシンを投与されたマウスが C 線維の減少にかかわらず侵害熱刺激に正常に反応するという矛盾

我々は生後各時期のマウスにカプサイシンを投与し、成熟後に L4 後根の無髄神経 (C 線維) の減少とそれに伴う熱刺激に対する応答変化について報告した<sup>130, 131)</sup>。予想外なことに、C 線維が顕著に減少 (約 70% 減) する生後 2 日、5 日目投与マウスにおける熱刺激に対する反応時間は対照群との間に有意差を認められなかった (図 11)。この矛盾は、遺伝子改変による VR1 完全欠損マウス<sup>128, 132)</sup> とこれらのマウスからの DRG ニューロン<sup>127)</sup> が侵害熱刺激に正常に反応するという知見と似ている。VR1 完全欠損マウスは 50℃ の熱に正常に反応する<sup>128, 132)</sup>。

しかし、52℃ 以上の熱に対して反応が遅くなる (痛覚鈍磨 hypoalgesia)<sup>132)</sup>。VR1 を保持している VR1 完全欠損マウスが 52℃ 以上の熱に正常に反応しないのは不思議である。それは VR1 が 52℃ 以上の熱で活性化するからである<sup>61)</sup>。カプサイシンに非感受性な VR1 を発現する A $\delta$  線維が正常な侵害熱刺激応答に主に関与している可能性がある<sup>132)</sup>。しかし、51 $\pm$ 0.3℃ の高閾値な大型の

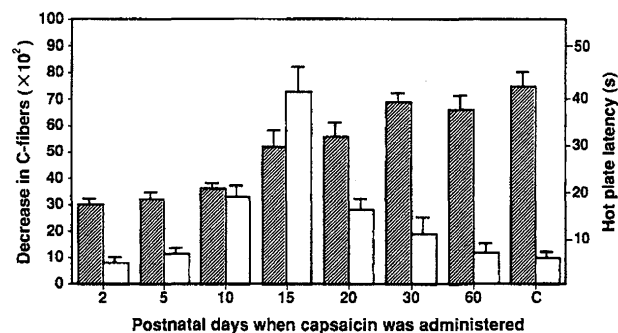


図11 生後2日から60日にカプサイシンを投与したマウスにおける L4 後根中の無髄神経の減少 (斜線棒) と熱板上での侵害熱刺激に反応するまでの時間 (白棒) との間の矛盾した関係。生後2日と5日目の投与マウスは顕著に C 線維の減少を示すが、反応時間は対照マウスと有意差がなかった (正常な反応)。生後10日と15日投与マウスでは、逆に反応時間が対照マウスに比べて有意に遅延した (痛覚鈍麻)。(文献131より転載)

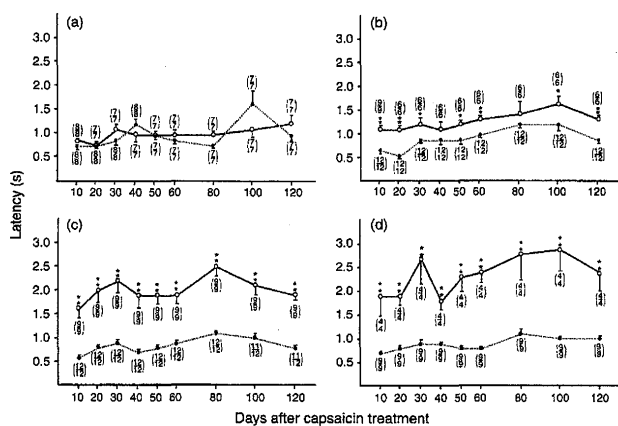


図12 生後2日目 (a)、5日目 (b)、10日目 (c)、15日目 (d) にカプサイシン投与マウスの侵害熱刺激 (足底に赤外線照射) に対する反応開始時間の投与後の変化 (白丸)。各グラフの分母は実験動物数を、分子は熱刺激に反応した動物数を示す。図11の熱板上での反応時間と同様に、生後2日目カプサイシン投与マウスでは C 線維 (侵害受容器) の顕著な減少にかかわらず、正常な反応を示した (矛盾)。だが、生後5日目投与マウスでは反応時間にわずかの遅延が認められた。\*は  $p < 0.05$ , \*\*は  $p < 0.01$  で対照 (黒丸) との有意差を示す。(文献131より転載)

DRG ニューロンはカプサイシンに非感受性である<sup>100)</sup>し、Aδ 線維がほとんど減少しない生後10～15日にカプサイシンを投与されたマウスが55℃の強い熱刺激に対して反応時間の大きな遅延を示すこと<sup>130)</sup>は先の推測に反する (図11)。生後5日目にカプサイシンを投与されたマウスでは、侵害熱刺激 (Hargreaves 法＝赤外線照射) に対する後足を引き上げるまでの時間は対照マウスより少しだけ遅延し、有意差を示すようになる (図12)。我々は、当初 C 線維の減少率と熱刺激に対する反応時間との不一致の原因として、後根中のカプサイシン非感受性ゆえに後角表層に残存している C 線維の中枢側終末からの発芽によるものと想定した<sup>131)</sup>。そこで、生後2日、10日、15日にカプサイシンを投与したマウスに抗 NGF (発芽抑制) と NGF (発芽促進) を30日間連続皮下投与した2つの実験群の間で、侵害熱刺激に対する後足の回避行動開始時間を比較した。その結果、抗 NGF 投与群では長く (痛覚鈍磨)、NGF 投与群では短くなる傾向を示した<sup>133)</sup>。しかし、対照群と比較して有意な差はなく、上記の矛盾に対する説明には不十分であった。末梢の神経を切断すると低閾値機械的刺激受容体を持つ A $\beta$  線維が後角表層で発芽し、後シナプス細胞との間に機能的なシナプス結合の形成が想定され、証明されている<sup>134-136)</sup>。我々の知る限り、カプサイシン処理した場合にそのような機能的な発芽とシナプス形成が起こることは証明されていない。このことに関して、Julius と Basbaum<sup>33)</sup> は、マイルドな熱に対する VR1 完全欠損マウスにおける正常な反応の場合は侵害受容器の数が少なくすみ、他方、高閾値温度を識別するためには多数の侵害受容器が必要である (VR1 完全欠損マウスの50℃以上の熱に対する無痛覚) と主張している。低閾値 (マイルドな熱刺激45～50℃) と高閾値 (55℃以上) の温度感受性は侵害受容性ニューロンの数とは違ったより複雑な要因によって決定されていると思われる。その理由として、新生仔期にカプサイシン投与されたマウスでは、小型の侵害受容性ニューロンは顕著に減少するが、高閾値温度 (55℃) に反応するからである<sup>131)</sup>。最近、Zimmermann ら<sup>137)</sup> は、TRPV2/3 が TRPV1 完全欠損マウスでみられる熱に対する遅延反応に関与しないことを報告した。それは、TRPV1/2/3 に対するアゴニストである2-アミノエトキシジフェニールボレート (2-APB) が TRPV1 完全欠損マウスの培養下 DRG ニューロンや伏在神経の付いた皮膚標本の熱反応を増大 (改善) できなかったことによる。マウス DRG の IB4 陽性ニューロンが胎生後半 (E15) から生後初期 (生後7.5日) の間に NGF 依存性から GDNF 依存性に転換するという報告がある<sup>115)</sup>。生後2～5日目のマウスのカプサイシン投与によって IB4 陰性 (VR1 陽性) な NGF 依存性 DRG ニューロンが選択的に消失し、そのため、残存する IB4 陽性 (VR1 陰性) ニューロンが侵害熱刺激に正常に反応することが考えられる。他方、生後10日あるいは15日にカプサイシン

投与されたマウスの IB4 陽性 (VR1 陰性) な GDNF 依存性ニューロンが破壊され、そのため、マウスは侵害熱刺激に対し異常な反応 (痛覚鈍磨) を示すことが考えられる。この仮定の基に我々は、カプサイシンの小型細胞に対する影響はマウスの生まれてからの生存期間によって異なり、また VR1 に関わりなく IB4 陽性ニューロンがマウスの急性侵害熱刺激に対する反応に重要な役割を果たしているという考えを提示した<sup>138)</sup>。この考えは、ラットの坐骨神経に IB4 結合サポニンを注入して (IB4 陽性ニューロンを選択的に破壊する)、IB4 陽性 DRG (L5) ニューロンを約65%消失させると、これらのラットが侵害熱刺激に対する反応時間の遅延を示した (痛覚鈍磨) という結果<sup>139)</sup>に支持される。それ故、IB4 陽性ニューロンは侵害熱刺激による急性反応にとって決定的に重要な要因だと指摘された<sup>139)</sup>。ラットでは IB4 陽性ニューロンのほとんどが VR1 陽性である<sup>97, 127)</sup> が、マウスの IB4 陽性ニューロンは VR1 陰性である。この2つの種の違いは、VR1 が急性の痛みの反応に決定的な要因ではないということを意味する<sup>138)</sup>。マウスの IB4 陽性ニューロンの機能的な役割についてはまだよく分かっていない。前述した様に、Woodbury ら<sup>127)</sup> は、TRPV1 完全欠損マウスが侵害熱刺激に対し正常に反応するという矛盾を説明するために、TRPV1 依存性と TRPV1/2 非依存性メカニズムがあるという仮説を提示した。病的状態で機能する TRPV1/2 依存性メカニズムの存在を証明するために、新生仔期にカプサイシンを投与されて C 線維の顕著な消失を示すマウスがブラディキニン (起炎物質)、カラゲナン、ATP などの皮下投与によって、TRPV1/2 完全欠損マウスに見られたように侵害熱刺激に痛覚鈍磨を示すかどうかを調べる必要がある。

“静かな侵害受容器” (silent nociceptors) は、内蔵の侵害受容器中に見られる<sup>140)</sup>。TRPV1/2 はその“静かな侵害受容器”のようである<sup>138)</sup>。それらの受容器は強い侵害刺激や炎症によって感作され、また高い閾値が低くなる。ごく最近、侵害受容性ニューロンと同様に IB4 陽性を示す非侵害受容性ニューロンが“静かな侵害受容器”であると提起された<sup>121)</sup>ことは興味深い。感作のメカニズムに関係すると考えられている TRPV1/3、TRPV1/TRPM8、TRPV1/TRPA1 というホモメリックあるいはヘテロメリックなチャネルの研究が、上記矛盾の説明に有効かもしれない。現在、このように矛盾の根底にあるメカニズムについて完全に説明することはできない。マウスの侵害熱刺激に見られる矛盾した行動反応はラットでは見られない<sup>141)</sup>。また、生後2日目にカプサイシンを投与されたマウスは侵害冷刺激 (1～2℃) に対して、熱刺激<sup>131)</sup>に対するとは異なり、明らかに反応開始時間の遅延を示した<sup>142)</sup>。TRPA1 を発現する小型 DRG ニューロンが侵害冷刺激を感受し、かつカプサイシンに感受性を有する可能性がある<sup>138)</sup>。

カプサイシンのような刺激物や物理的な侵害刺激



によって誘導される特殊な小型知覚ニューロン内へのカルシウム流入は、おそらく、他の細胞内メカニズムを活性化する。侵害受容性ニューロンでの細胞内シグナル経路に関する現在の知見はチャネル開閉のメカニズムを説明するのに十分はでないし、それはこの総説の目的ではない。それについて詳しく知りたければ、Bevan<sup>143)</sup>, Woolf と Salter<sup>144)</sup>, Julius と Basbaum<sup>33)</sup>, 西田ら<sup>145)</sup>, Nagy ら<sup>58)</sup> の総説を参照されたい。特に Woolf と Salter<sup>144)</sup> は、侵害受容細胞内の痛みのシグナル伝達を、活性化、調節(可逆的变化)、変容(遺伝的变化)に分けてその概要を紹介している。

## 展 望

- (1) マウスの一次知覚ニューロンの成長過程で、いつ TRPV サブファミリーメンバーが発現また消失するかを明らかにすることは、新生仔期のカプサイシン投与による小型知覚ニューロン(侵害受容器)の顕著な減少にかかわらず、侵害熱刺激に対して正常に反応するという矛盾を説明することに役立つと考えられる。成熟マウスの小型知覚ニューロンはカプサイシンの神経毒作用に抵抗性があるのに、なぜ様々なタイプの侵害刺激に反応することができるのであろうか?
- (2) 正常マウスの小型一次知覚ニューロンにおける、カプサイシン非感受性で IB4 陽性 (VR1 陰性) ニューロンが侵害熱刺激の伝達に中心的な役割を果たしている可能性がある。
- (3) 痛覚伝達における複雑な現象を理解するために、カプサイシン、プロトン、侵害熱刺激の VR1 に対する作用部位とそれらによる VR1 の態様変化の解明が必要と思われる。
- (4) TRP 複合体 (TRP タンパク、神経栄養因子レセプター、ホスホリパーゼ C などの酵素、カルシウム結合タンパクなど) のそれぞれについての研究が、カプサイシン受容体の感作や脱感作のメカニズムの解明に必要である。

## 謝 辞

著者らのいくつかの研究は文部省(現文部科学省)の科研費(5957055, 07671973)で行われた。著者らの動物実験はヘルシンキ宣言に依拠し、徳島大学動物実験委員会の承認の下で行った。この総説をまとめるに当たり助言と激励を得た熊本栄一教授(佐賀大学医学部神経生理学教室)に謝意を表します。

なお、本総説は ASI 編集長と Blackwell Publishing による転載許可を得たうえで著者らの英文総説(文献138)を和訳、加筆したものであることを付記する。

## 文 献

- 1) Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD and Julius D: The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824 (1997)
- 2) Szállási A and Blumberg PM: Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51, 159-212 (1999)
- 3) 野崎倫生: トウガラシの辛味成分の化学. トウガラシ辛味の科学-(岩井和夫, 渡辺達夫編). 第1版. 東京, 幸書房, 2000, 19-31
- 4) Govindarajan VS: Capsaicin-production, technology, chemistry, and quality. Part III. Chemistry of the color, aroma, and pungency stimuli. *Crit Rev Food Sci Nutr* 24, 245-355 (1986)
- 5) Nelson EK: The constitution of capsaicin, the pungent principal of capsicum. *J Am Chem Soc* 41, 1115-1121 (1919)
- 6) Naj A: 林真理, 奥田祐子, 山本紀夫(訳): トウガラシの文化史. 第1版, 晶文社, 東京, 1998: *Peppers: A Story of Hot Pursuits*, 1992
- 7) Porszasz J and Jancsó N: Studies on the action potential of sensory nerves in animals desensitized with capsaicin. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 16, 299-306 (1959)
- 8) Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J and Jancsó N: Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structures by capsaicin in rats. *J Physiol* 208, 449-459 (1970)
- 9) Jancsó G, Király E and Jancsó-Gábor A: Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurons. *Nature* 270, 741-743 (1977)
- 10) Szolcsányi J and Jancsó-Gábor A: Sensory effects of capsaicin congeners. I. Relationship between chemical structure and pain producing potency of pungent agents. *Arzneimittelforschung* 25, 1877-1881 (1975)
- 11) Bevan S and Szolcsányi J: Sensory neuron-specific action of capsaicin: Mechanisms and applications. *Trends Pharmacol Sci* 11, 330-333 (1990)
- 12) de Vries DJ and Blumberg PM: Thermoregulatory effects of resiniferatoxin in the mouse: Comparison with capsaicin. *Life Sci* 44, 711-715 (1989)
- 13) Szállási A and Blumberg PM: Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* 30, 515-520 (1989)
- 14) Jonassohn M, Hjertberg R, Anke H, Dekermendjian K, Szállási A, Thines E, Witt R and Sterner O: The preparation and bioactivities of (-)-isovalleral. *Bioorg Med Chem* 5, 1363-1367 (1997)
- 15) Szállási A, Biro T, Szabo T, Modarres S, Petersen M, Klusch A, Blumberg PM, Krause JE and Sterner O: A
- 1) Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA,



- non-pungent triphenyl phenol of fungal origin, scutigerol, stimulates rat dorsal root ganglion neurons via interaction at vanilloid receptors. *Br J Pharmacol* 126, 1351-1358 (1999)
- 16) Winter J, Dray A, Wood JN, Yeats JC and Bevan S: Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: A potent sensory neuron excitation. *Brain Res* 520, 131-140 (1990)
- 17) Victory SM, Appendino G and Vander Velde DG: Conformational studies on resiniferatoxin (RTX), an ultrapotent vanilloid agonist. *Bioorg Med Chem* 6, 223-229 (1998)
- 18) Szállási A and Blumberg PM: Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. *Life Sci* 47, 1399-1408 (1990)
- 19) Szolcsányi J and Jancsó-Gábor A: Sensory effects of capsaicin congeners. II. Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Arzneimittelforschung* 26, 33-37 (1976)
- 20) Liu L, Lo YC, Chen IJ and Simon SA: The responses of rat trigeminal ganglion neurons to capsaicin and two nonpungent vanilloid receptor agonists, olvanil and glyceryl nonamide. *J Neurosci* 17, 4101-4111 (1997)
- 21) Szállási A and Blumberg PM: Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Res* 524, 106-111 (1990)
- 22) Winter J, Walpole CS, Bevan S and James IF: Characterization of resiniferatoxin binding sites on sensory neurons: Co-regulation of resiniferatoxin binding and capsaicin sensitivity in adult rat dorsal root ganglia. *Neuroscience* 57, 747-757 (1993)
- 23) Acs G, Palkovits M and Blumberg PM: Comparison of [<sup>3</sup>H] resiniferatoxin binding by the vanilloid (capsaicin) receptor in dorsal root ganglia, spinal cord, dorsal vagal complex, sciatic and vagal nerve and urinary bladder of the rat. *Life Sci* 55, 1017-1026 (1994)
- 24) Szállási A, Nilsson S, Farkas-Szállási T, Blumberg PM, Hökfelt T and Lundberg JM: Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: Distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery and depletion following systemic vanilloid treatment. *Brain Res* 703, 175-183 (1995)
- 25) Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, Walpole CS and Yeats JC: Capsazepine: A competitive antagonist of the sensory neuron excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* 107, 544-552 (1992)
- 26) Warde KA, Furey G and Sanger GJ: Pharmacological characterization of the vanilloid receptor in the rat isolated vas deferens. *J Pharm Pharmacol* 48, 285-291 (1996)
- 27) Liu L, Szállási A and Simon SA: A non-pungent resiniferatoxin analogue, phorbol 12-phenylacetate 13-acetate 20-homovanillate, reveals vanilloid receptor subtypes on rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* 84, 569-581 (1998)
- 28) Cohl LA: The effects of ruthenium red on the responses of guinea-pig ileum to capsaicin. *Eur J Pharmacol* 169, 241-247 (1989)
- 29) Takaki M, Nakayama S and Suga H: Possible mechanism of ruthenium red antagonism of capsaicin-induced action in the isolated guinea pig ileum. *Eur J Pharmacol* 211, 125-127 (1992)
- 30) Acs G, Biro T, Acs P, Modarres S and Blumberg PM: Differential activation of sensory neurons by resiniferatoxin. *J Neurosci* 17, 5622-5628 (1997)
- 31) Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H and Tominaga M: Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 8002-8006 (2003)
- 32) Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI and Julius D: The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543 (1998)
- 33) Julius D and Basbaum AI: Molecular mechanism of nociception. *Nature* 413, 203-210 (2001)
- 34) Zygmunt PA, Petersson J, Andersson DA, Chuang H-h, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D and Hogestatt ED: Vanilloid receptors on sensory nerves mediated the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452-457 (1999)
- 35) Van Der Stelt M and Di Marzo V: Endovanilloids. *Eur J Biochem* 271, 1827-1840 (2004)
- 36) Minke B, Chun-Fang W and William LP: Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258, 84-87 (1975)
- 37) Cosens DJ and Manning A: Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224, 285-287 (1969)
- 38) Montell C and Rubin GM: Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2, 1313-1323 (1989)
- 39) Minke B and Cook B: TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* 82, 429-472 (2002)
- 40) Clapham DE: TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-524 (2003)
- 41) Liman ER: Thermal gating of TRP ion channels: Food for thought? *Science's STKE* 326, pe12 (2006)
- 42) Liman ER, Corey DP and Dulac C: TRP2: A candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory

- signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 5791-5796 (1999)
- 43) Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C and Koentges G: Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science* 295, 1493-1500 (2002)
  - 44) Wang GX and Poo MM: Requirement of TRPC channels in netrin-1-induced chemotropic turning of nerve growth cones. *Nature* 434, 898-904 (2005)
  - 45) Li Y, Jia YC, Cui K, Li N, Zheng ZY, Wang YZ and Yuan XB: Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 434, 894-898 (2005)
  - 46) Corey DP: New TRP channels in hearing and mechanosensation. *Neuron* 39, 585-588 (2003)
  - 47) Vennekens R, Voets T, Bindels RJM, Droogmans G and Nilius B: Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell Calcium* 31, 253-264 (2002)
  - 48) Szolcsányi J: Actions of capsaicin on sensory receptors. In: *Capsaicin in the Study of Pain* (Wood J, ed), Academic Press, London, 1-26 (1993)
  - 49) Jordt S-E and Julius D: Molecular basis for species-specific sensitivity to 'hot' chili peppers. *Cell* 108, 421-430 (2002)
  - 50) Gavva NR, Klionsky L, Qu Y, Shi L, Tamir R, Edenson S, Zhang TJ, Viswanadhan VN, Toth A, Pearce LV, Vanderah TW, Porreca F, Blumberg PM, Lile J, Sun Y, Wild K, Lois JC and Treanor JJS: Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem* 279, 20283-20295 (2004)
  - 51) Ferrer-Montiel A, Garcia-Martínez C, Morenilla-Palao C, Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G and Planells-Cases R: Molecular architecture of the vanilloid receptor. *Eur J Biochem* 271, 1820-1828 (2004)
  - 52) Kim S, Kang C, Shin CY, Hwang SW, Yang YD, Shim WS, Park MY, Kim E, Kim M, Kim BM, Cho H, Shin Y and Oh U: TRPV1 recapitulates native capsaicin receptor in sensory neurons in association with Fas-associated factor 1. *J Neurosci* 26, 2403-2412 (2006)
  - 53) Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM and Szállási A: Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3655-3660 (2000)
  - 54) Kim SR, Lee DY, Chung ES, Oh UT, Kim SU and Jin BK: Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates cell death of mesencephalic dopaminergic neurons in vivo and in vitro. *J Neurosci* 25, 662-671 (2005)
  - 55) Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ and Caterina MJ: Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 13396-13401 (2001)
  - 56) Avelio G, Cruz C, Nagy I and Cruz F: Vanilloid receptor 1 expression in the rat urinary tract. *Neuroscience* 109, 787-798 (2002)
  - 57) Inoue K, Koizumi S, Fujisawa S, Denda S and Denda M: Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 124-129 (2002)
  - 58) Nagy I, Sántha P, Jancsó G and Urbán L: The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur J Pharmacol* 500, 351-369 (2004)
  - 59) Okumura R, Shima K, Muramatsu T, Nakagawa K, Shimono M, Suzuki T, Magloire H and Shibukawa Y: The odontoblast as a sensory receptor cell? The expression of TRPV1 (VR-1) channels. *Arch Histol Cytol* 68, 251-257 (2005)
  - 60) Morikawa Y: Oncostatin M in the development of the nervous system. *Anat Sci Int* 80, 53-59 (2005)
  - 61) Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ and Julius D: A capsaicin receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436-441 (1999)
  - 62) Lewinter RD, Skinner K, Julius D and Basbaum AI: Immunoreactive TRPV-2 (VRL-1), a capsaicin receptor homolog, in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 470, 400-408 (2004)
  - 63) Ringkamp M, Peng YB, Wu G, Harkte TV, Campbell JN and Meyer RA: Capsaicin responses in heat-sensitive and heat-insensitive A-fiber nociceptors. *J Neurosci* 21, 4460-4468 (2001)
  - 64) Caterina MJ and Julius D: The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 24, 487-517 (2001)
  - 65) Tamura S, Morikawa Y and Senba E: TRPV2, a capsaicin receptor homologue, is expressed predominantly in the neurotrophin-3-dependent subpopulation of primary sensory neurons. *Neuroscience* 130, 223-228 (2005)
  - 66) Kanzaki M, Zhang YQ, Mashima H, Li L, Shibata H and Kojima I: Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-1. *Nat Cell Biol* 1, 165-170 (1999)
  - 67) Iwata Y, Katanosaka Y, Arai Y, Komamura K, Miyatake K and Shigekawa M: A novel mechanism of myocyte degeneration involving the  $Ca^{2+}$ -permeable growth factor-regulated channel. *J Cell Biol* 161, 957-967 (2003)
  - 68) Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S and Patapoutian A: A heat-sensitive

- TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296, 2046-2049 (2002)
- 69) Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin J-P, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P and Davis JB: TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418, 186-190 (2002)
- 70) Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R and Clapham DE: TRPV3 is a calcium permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418, 181-186 (2002)
- 71) Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KSR, Andahazy M, Story GM and Patapoutian A: Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307, 1468-1472 (2005)
- 72) Guler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M and Caterina M: Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 22, 6408-6414 (2002)
- 73) Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G and Nilius B: Heat-evoked activation of TRPV4 channels in HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 277, 47044-47051 (2002)
- 74) Chung MK, Lee H and Caterina MJ: Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *J Biol Chem* 278, 32037-32046 (2003)
- 75) Chung MK, Lee H, Mizuno A, Suzuki M and Caterina MJ: TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J Biol Chem* 279, 21569-21575 (2004)
- 76) Yue L, Peng JB, Hediger MA and Clapham DA: CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* 410, 705-709 (2001)
- 77) den Dekker E, Hoenderop JG, Nilius B and Bindels RJ: The epithelial calcium channels, TRPV5 and TRPV6: From identification towards regulation. *Cell Calcium* 33, 497-507 (2003)
- 78) Harteneck C, Plant TD and Schultz G: From worm to man: Three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci* 23, 159-166 (2000)
- 79) Zhang Y, Hoon MA, Chandrasekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS and Ryba NJP: Coding of sweet, bitter, and umami tastes: Different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112, 293-301 (2003)
- 80) Mckemy DD, Neuhauser WM and Julius D: Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52-58 (2002)
- 81) Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S and Patapoutian A: A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108, 705-715 (2002)
- 82) Premkumar LS, Raisinghani M, Pingle SC, Long C and Pimentel F: Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation. *J Neurosci* 25, 11322-11329 (2005)
- 83) Jaquemar D, Schenker T and Trueb B: An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem* 274, 7325-7333 (1999)
- 84) Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegra T, Bevan S and Patapoutian A: ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperature. *Cell* 112, 819-829 (2003)
- 85) Jordt S-E, Bautista DM, Chuang Hh, Mckemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID and Julius D: Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427, 260-265 (2004)
- 86) Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ and Patapoutian A: Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent components and bradykinin. *Neuron* 41, 849-857 (2004)
- 87) Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung ELM, Derfler BH, Duggan A, Geleoc GSG, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D and Zhang DS: TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 432, 723-730 (2004)
- 88) Nagata K, Duggan A, Kumar G and Garcia-Anoveros J: Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* 25, 4052-4061 (2005)
- 89) Hanaoka K, Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Piontek K, Tsiokas L, Sukhatme VP, Guggino WB and Germino GG: Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable current. *Nature* 408, 990-994 (2000)
- 90) Sun M, Goldin E, Stahl S, Falardeau JL, Kennedy JC, Acierno Jr JS, Bove C, Kaneski CR, Nagle J, Bromley MC, Colman M, Schiffmann R and Slaugenhaupt SA: Mucopolidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum Mol Genet* 9, 2471-2478 (2000)
- 91) Cortright DN, Crandall M, Sanchez JF, Zou T, Krause JE and White G: The tissue distribution and functional

- characterization of human VR1. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 1183-1189 (2001)
- 92) Coggeshall RE: Dorsal root ganglion cells and their process. In: *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord* (Willis Jr WD, Coggeshall RE, eds). Plenum Press, New York, 47-78 (1991)
  - 93) Lawson SN: Neurochemistry of cutaneous nociceptors. In: *Neurobiology of Nociceptors* (Belmonte C, Cervero F, eds). Oxford University Press, New York, 72-91 (1996)
  - 94) Perl ER: Pain and the discovery of nociceptors. In: *Neurobiology of Nociceptors* (Belmonte C, Cervero F, eds). Oxford University Press, New York, 5-36 (1996)
  - 95) Helliwell RJA, McLatchie LM, Clarke M, Winter J, Bevan S and McIntyre P: Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci Lett* 250, 177-180 (1998)
  - 96) Hiura A: Neuroanatomical effects of capsaicin on the primary afferent neurons. *Arch Histol Cytol* 63, 199-215 (2000)
  - 97) Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X and Elde R: Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): Relationship to neuropeptides, the P2X<sub>3</sub> purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* 11, 946-958 (1999)
  - 98) Hiura A and Sakamoto Y: Quantitative estimation of the effects of capsaicin on the mouse primary sensory neurons. *Neurosci Lett* 76, 101-106 (1987)
  - 99) Hiura A, Nakae Y and Nakagawa H: Cell death of primary afferent nerve cells in neonatal mice treated with capsaicin. *Anat Sci Int* 77, 47-50 (2002)
  - 100) Nagy I and Rang HP: Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 88, 995-997 (1999)
  - 101) Stucky CL and Lewin GR: Isolectin B<sub>4</sub>-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *J Neurosci* 19, 6497-6505 (1999)
  - 102) Kashiba H, Uchida Y and Senba E: Difference in binding by isolectin B<sub>4</sub> to trkA and c-ret mRNA-expressing neurons in rat sensory ganglia. *Mol Brain Res* 95, 18-26 (2001)
  - 103) Zwick M, Davis BM, Woodbury CJ, Burkett JN, Koerber HR, Simpson JF and Albers KM: Glial cell line-derived neurotrophic factor is a survival factor for isolectin B<sub>4</sub>-positive, but not vanilloid receptor 1-positive, neurons in the mouse. *J Neurosci* 22, 4057-4065 (2002)
  - 104) Liu M, Willmott NJ, Michael GJ and Priestley JV: Differential pH and capsaicin responses of *Griffonia simplicifolia* IB4 (IB4)-positive and IB4-negative small sensory neurons. *Neuroscience* 127, 659-672 (2004)
  - 105) Mäkelä O and Mäkelä P: Some new blood group specific phytagglutinins: A preliminary report. *Ann Med Exp Biol Fenn* 34, 402-404 (1956)
  - 106) Hayes CE and Goldstein IJ: An  $\alpha$ -D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J Biol Chem* 249, 1904-1914 (1974)
  - 107) Streit WJ, Schulte BA, Balentine JD and Spicer SS: Histochemical localization of galactose-containing glycoconjugates in sensory neurons and their processes in the central and peripheral nervous system of the rat. *J Histochem Cytochem* 33, 1042-1052 (1985)
  - 108) Streit WJ, Schulte BA, Balentine JD and Spicer SS: Evidence for glycoconjugate in nociceptive primary sensory neurons and its origin from Golgi complex. *Brain Res* 377, 1-17 (1986)
  - 109) Knyihár-Csillik E and Csillik B: FRAP: Histochemistry of the primary nociceptive neuron. *Prog Histochem Cytochem* 14, 1-137 (1981)
  - 110) Nagy JI and Hunt SP: Fluoride-resistant acid phosphatase-containing neurons in dorsal root ganglia are separate from those containing substance P or somatostatin. *Neuroscience* 7, 89-97 (1982)
  - 111) Silverman JD and Kruger L: Selective neuronal glycoconjugate expression in sensory and autonomic ganglia: Relation of lectin reactivity to peptide and enzyme markers. *J Neurocytol* 19, 789-801 (1990)
  - 112) Silverman JD and Kruger L: Lectin and neuropeptide labeling of separate population of dorsal root ganglion neurons and associated 'nociceptor' thin axons in rat testis and cornea whole-mount preparations. *Somatosens Mot Res* 5, 259-267 (1988)
  - 113) Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G and Wood JN: A P2X prinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377, 428-431 (1995)
  - 114) Lin LFH, Doherty DH, Lile JD, Baktesh S and Collins F: GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130-1132 (1993)
  - 115) Molliver DC, Wright DE and Leitner ML, Parsadanian AS, Doster K, Wen D, Yan Q and Snider WD: IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* 19, 849-861 (1997)
  - 116) Snider WD and McMahon SB: Tackling pain at the source: New ideas about nociceptors. *Neuron* 20, 629-632 (1998)
  - 117) Boucher TJ, Okuse K, Bennett DLH, Munson JB, Wood JN and McMahon SB: Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. *Science* 290, 124-127 (2000)

- 118) Amaya F, Oh-hashii K, Naruse Y, Iijima N, Ueda M, Shimosato G, Tominaga M, Tanaka Y and Tanaka M: Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. *Brain Res* 963, 190-196 (2003)
- 119) Amaya F, Shimosato G, Nagano M, Ueda M, Hashimoto S, Tanaka Y, Suzuki H and Tanaka M: NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. *Eur J Neurosci* 20, 2303-2310 (2004)
- 120) Breese NM, George AC, Pauers LE and Stucky CL: Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse. *Pain* 115, 37-49 (2005)
- 121) Fang X, Djouhri L, McMullan S, Berry C, Waxman SG, Okuse K and Lawson SN: Intense isolectin-B4 binding in rat dorsal root ganglion neurons distinguishes C-fiber nociceptors with broad action potentials and high Nav 1.9 expression. *J Neurosci* 26, 7281-7292 (2006)
- 122) Yasuhara O, Aimi Y, Shibano A, Matsuno A, Bellier JP, Park M, Tooyama I and Kimura H: Innervation of rat iris by trigeminal and ciliary neurons expressing pChAT, a novel splice variant of cholin acetyltransferase. *J Comp Neurol* 472, 232-245 (2004)
- 123) Hiura A and Nakagawa H: Capsaicin-resistant nonspecific acetylcholinesterase (NsAChE) reactive nerve fibers in the rat cornea: A quantitative and developmental study. *Okajimas Folia Anat Jpn* 81, 75-84 (2004)
- 124) Hiura A and Nakagawa H: Induction of corneal lesion and nerve fiber sprouting by neonatal capsaicin application depends on the dose of the drug and survival time after treatment. *Okajimas Folia Anat Jpn* 82, 57-66 (2005)
- 125) Dirajlal S, Pauers LE and Stucky CL: Differential response properties of IB4-positive and -negative unmyelinated sensory neurons to protons and capsaicin. *J Neurophysiol* 89, 513-524 (2003)
- 126) Leffler A, Monter B and Koltzenburg M: The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice. *Neuroscience*, 139, 699-709 (2006)
- 127) Woodbury CJ, Zwick M, Wang S, Lawson JJ, Caterina MJ, Koltzenburg M, Albers KM, Koerber HR and Davis BM: Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses. *J Neurosci* 24, 6410-6415 (2004)
- 128) Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A and Sheardown SA: Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405, 183-187 (2000)
- 129) Hucho TB, Dina OA and Levine JD: Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: An isolectin B4(+) neuron-specific mechanism. *J Neurosci* 25, 6119-6126 (2005)
- 130) Hiura A, Villalobos EL and Ishizuka H: Age-dependent attenuation of the decrease of C fibers by capsaicin and its effects on responses to nociceptive stimuli. *Somatosens Motor Res* 9, 37-43 (1992)
- 131) Hiura A, Nakagawa H, Koshigae Y, Yoshizako A, Kubo Y and Ishizuka H: Age-related changes in the response to thermal noxious heat and reduction of C-fibers by neonatal treatment with capsaicin. *Somatosens Motor Res* 16, 115-121 (1999)
- 132) Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitl KR, Koltzenburg M, Basbaum AI and Julius D: Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313 (2000)
- 133) 中川弘, 樋浦明夫, 久保吉廣: 新生仔期にカプサイシン投与したマウスの侵害熱刺激応答に対する抗 NGF と NGF の影響. *日薬理誌* 116, 93-100 (2000)
- 134) Woolf CJ, Shortland P, Reynolds M, Ridings J, Doubell T and Coggeshall RE: Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 360, 121-134 (1995)
- 135) Koerber HR, Mirnics K, Kavookjian AM and Light AR: Ultrastructural analysis of ectopic synaptic boutons arising from peripherally regenerated primary afferent fibers. *J Neurophysiol* 81, 1636-1644 (1999)
- 136) Kohama I, Ishikawa K and Kocsis JD: Synaptic reorganization in the substantia gelatinosa after peripheral nerve neuroma formation: Aberrant innervation of lamina II neurons by A $\beta$  afferents. *J Neurosci* 20, 1538-1549 (2000)
- 137) Zimmermann K, Leffler A, Fischer MMJ, Messlinger K, Nau C and Reeh PW: The TRPV1/2/3 activator 2-aminoethoxyphenyl borate sensitizes native nociceptive neurons to heat in wild type but not TRPV1 deficient mice. *Neuroscience* 135, 1277-1284 (2005)
- 138) Nakagawa H and Hiura A: Capsaicin, transient receptor potential (TRP) protein subfamilies and the particular relationship between capsaicin receptors and small primary sensory neurons. *Anat Sci Int* 81, 135-155 (2006)
- 139) Vulchanova L, Olson TH, Stone LS, Riedl MS, Elde R and Honda CN: Cytotoxic targeting of isolectin IB4-binding sensory neurons. *Neuroscience* 108, 143-155 (2001)

- 140) Cervero F: Visceral nociceptors. In: *Neurobiology of Nociceptors* (Belmonte C, Cervero F, eds). Oxford University Press, New York, 220-240 (1996)
- 141) Holzer P, Jurna I, Gamse R and Lembeck F: Nociceptive threshold after neonatal capsaicin treatment. *Eur J Pharmacol* 58, 511-514 (1979)
- 142) 樋浦明夫, 石塚寛: カプサイシン投与マウスの侵害冷刺激と機械的刺激に対する応答性—生後の経時的投与による変化. *東邦医誌* 41, 8-17 (1994)
- 143) Bevan S: Intracellular messengers and signal transduction in nociceptors. In: *Neurobiology of Nociceptors* (Belmonte C, Cervero F, eds). Oxford University Press, New York, 298-324 (1996)
- 144) Woolf CJ and Salter MW: Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. *Science* 288, 1765-1768 (2000)
- 145) 西田基宏, 原雄二, 井上隆司, 森泰生: カルシウムチャネル研究の新たな展開 — TRP チャネルを中心としたシグナル複合体形成と細胞の増殖・死の制御. *日薬理誌* 121, 223-232 (2003)
- 146) Hiura A and Ishizuka H: Changes in features of degenerating primary afferent neurons with time after capsaicin treatment. *Acta Neuropathol* 78, 35-46 (1989)
- 147) Hiura A and Ishizuka H: Early morphological changes of primary afferent neurons and their processes in newborn mice after treatment with capsaicin. *Exp Brain Res* 101, 203-215 (1994)